Ueber die alkoholische Hefegärung und das Verhalten des Gärungs- und Atmungsfermentes der Hefe gegen antiseptische Stoffe

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

genehmigt von der

Philosophischen Fakultät der Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Berlin

von

Nasrollah Homayoun Alamir

aus

Teheran (Persien).

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Februar 1933

Tag der Promotion: 12. Juli 1933.

Spezialdruckerei für Dissertationen Dr. Hermann Eschenhagen, KG., Ohlau i. Schl.

532

Referenten:

Prof. Dr. Dr. Th. Sabalitschka

Prof. Dr. C. Mannich

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Einleitung.

Die Forscher, die bei Studien über die Giftwirkung chemischer Stoffe auf Mikroorganismen auch die Hefe als Testobjekt benutzen, prüften fast ausschließlich die Beeinflussung der Gärfähigkeit der Hefe durch die Giftstoffe. Es war daher angezeigt, den Einfluß solcher Giftstoffe auf mehrere Lebensfunktionen der Hefe vergleichend zu prüfen und festzustellen, ob diese durch die Giftstoffe gleichmäßig oder verschieden beeinflußt werden.

Auf Veranlassung von Herrn Prof. Dr. Th. Sabalitschka ging ich dem Einfluß bekannter carbocyclischer Giftstoffe auf die Gärkraft und auf die Atmung der Hefe nach und untersuchte zugleich die abtötende Wirkung derselben Stoffe auf die Hefezelle. Als Giftstoffe verwendete ich die Benzoesäure und Oxybenzoesäuren, Ester und Aether solcher Säuren und das Phenol.

Es war notwendig, vor der Ausführung der von mir beabsichtigten Versuche Aufklärung über verschiedene, gemäß den bisherigen Beobachtungen zu befürchtenden Störungen beizubringen, damit diese ausgeschaltet werden könnten. So war eine Störung durch die sog. Induktionsperiode, d. h. durch den verzögerten Gärungsbeginn bei einer durch Trocknen oder sonstwie geschädigten Hefe zu befürchten. Um eine Abtötung der Hefe bei den Giftstoffen festzustellen, sollte die Färbbarkeit benutzt werden. Die Brauchbarkeit der Färbbarkeit zu diesem Zwecke ist in letzter Zeit wiederholt auf Grund bestimmter Beobachtungen bestritten worden. So stellte unlängst Schmerl fest, daß die doch als tot anzusprechende Acetonhefe, die aber noch gärfähig ist, bei längerem Verweilen in einem Gärsubstrat ihre ursprüngliche, starke Färbbarkeit mit Methylenblau vollkommen verliert, sich also scheinbar wie eine lebende Hefe verhält. Außerdem ist bekannt, daß die einzelnen Farbstoffe nicht gleich gut für die Charakterisierung toter und lebender Hefezellen geeignet

sind. Wiederholt ist ferner in der Literatur berichtet, daß schon vor Eintritt der Gärung Zucker in erheblicher Menge aus einer mit Hefe versetzten Zuckerlösung verschwindet, ohne daß man über dieses Verschwinden eine endgültige Aufklärung bisher beibringen konnte.

Die Untersuchungen gliedern sich somit in

I. Vorversuche
   1. Induktionsperiode.
   2. Aufnahme von Farbstoffen durch Aceton- und Trokkenhefe.
   3. Brauchbarkeit der Farblösungen zur Unterscheidung von frischer und toter Hefe.
   4. Angeblicher Zuckerschwund vor Beginn der Gärung.

II. Einwirkung von Giftstoffen auf die lebende Hefezelle
   1. Beeinflussung der Gärkraft der Hefe.
   2. Beeinflussung der Atmung der Hefe im Vergleich mit der gleichzeitigen Beeinflussung ihrer Gärkraft.
   3. Abtötende Wirkung.

I. Vorversuche.

1. Induktionsperiode.

Bereits seit Buchner[1]) ist es bekannt, daß bei der „zellfreien" Gärung (bei Buchner Hefepreßsaft) bei sehr geringer Zymasekonzentration nicht wie bei Gärung mit frischer Hefe das Substrat sofort in Gärung versetzt wird. Vielmehr vergeht einige Zeit bis die Gärung ansetzt. Bei zu verdünnten Enzymkonzentrationen kann sogar der Fall eintreten, daß die Gärung selbst nach Tagen nicht einsetzt. Die Dauerhefen zeigen ein ähnliches Verhalten. Die Dauerhefegärung (unter „Dauerhefe" versteht man Trocken-, Aceton- oder Alkohol-Aether-Hefe) ruft ebenfalls eine Periode hervor, in der keine Gärung ersichtlich ist. Darauf fängt die Gärung plötzlich an, sodaß mit Leichtigkeit die Periode des „Nochnichtgärens" zeitlich meßbar ist. Lebedew hat erst dieser Ruheperiode mehr Beachtung geschenkt, vor allen Dingen bei dem von ihm entdeckten Mazerationssaft (der dadurch entsteht, daß bei geeigneter Temperatur getrocknete Hefe, mit Wasser versetzt der Plasmolyse unterworfen wird). Die besagte Periode wurde von Lebedew[2]) als die „Induktionsperiode" bezeichnet und dieser Ausdruck ist auch für die Ruheperiode bei den Dauerhefen eingeführt worden.

Meyerhof[3]) begann nun die Untersuchungen über die Induktionserscheinungen bei dem Mazerationssaft. Er untersuchte zunächst den Einfluß der verschiedenen Zuckerarten und anderer Faktoren auf die Induktion, um dann zu finden, daß bereits ein Zusatz von 0,2 Millimol Hexosediphosphat imstande ist, die Induktion augenblicklich aufzuheben, so daß die Gärung sofort einsetzt.

Da das Hexosediphosphat in solch geringsten Konzentrationen die Induktionszeit bei dem Mazerationssaft momentan aufhebt, sei die Rolle des Hexosediphosphats bei der alkoholischen Gärung im allgemeinen erläutert.

Nachdem Wroblewski[4]) gefunden hatte, daß Natriumphosphat die Gärwirkung eines gegebenen Volumens Preß-

saft erhöht, veröffentlichten Harden & Young Arbeiten, die die wesentliche Rolle der Phosphate bei der Gärung aufklärten. Zunächst sei erwähnt, daß Iwanoff[5]) gezeigt hatte, daß bei Anwendung von Trockenhefe zugesetzte Phosphate ihre Fällung mit Uranazetat verlieren und organisch gebunden werden. Harden und Young gingen nun der Steigerung der Gärgeschwindigkeit bei Zusatz anorganischen Phosphats nach, konnten quantitative Verhältnisse aufdecken und kamen schließlich auf Grund ihrer Ergebnisse über die Beziehung zwischen gebildetem Alkohol und Kohlendioxyd und der Zusammensetzung des organischen Phosphats, zu folgenden Gärungsgleichungen:

(I) $2\ C_6H_{12}O_6 + 2\,PO_4HR_2 = 2CO_2 + 2\ C_2H_5OH + 2\ H_2O + C_6H_{10}O_4\ (PO_4R_2)_2$
(II) $C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2 + 2\ H_2O = C_6H_{12}O_6 + 2\ PO_4HR_2$

Das nach Gleichung (I) entstehende organische Phosphat wird mittels eines synthetisierenden Enzyms, der Phosphatese, gebildet, was zuerst von L. Iwanoff[6]) behauptet und auch von Harden & Young[7]), sowie von Euler & Ohlsen angenommen wurde. Diesen Letztgenannten gelang es auch zu zeigen, daß die Phosphatese von den übrigen Gärungsenzymen oder wenigstens von demjenigen Teil derselben, der die Bildung von Kohlensäure und Alkohol hervorruft, abgetrennt werden kann.

Für die Zurückbildung des anorganischen Phosphats aus dem organischen nehmen nun Harden & Young[8]) die Mitwirkung eines weiteren, abbauenden Enzyms an, das sie Phosphatase benennen. Es sei in diesem Zusammenhang erwähnt, daß die Ergebnisse von Harden & Young[9]) über die Bildung und Zerlegung des organischen Phosphates bei der alkoholischen Gärung von Euler & Johannson[10]) vollauf bestätigt worden sind.

Nachdem Meyerhof die Aufhebung der Induktion bei dem Mazerationssaft hervorrufen konnte, fing die große Reihe von Versuchen an, um die Induktionszeit bei den Dauerhefen zu erklären.

Insbesondere waren es die Forscher Harden, Abderhalden & Fodor, sowie Sobotka, die eingehende Versuche zur Erklärung der Induktionserscheinung bei den Dauerhefen anstellten.

Harden u. Young[11]) beschrieben das Verhalten des Zymins (Acetonhefe) wenn gleiche Mengen desselben mit verschiede-

nen Volumina Zuckerlösung ein und derselben Konzentration zur Gärung angesetzt wurden. Sie fanden, daß bei großen Volumina Zuckerlösung eine Induktionsperiode einsetzte, die immer mehr zunahm je geringer die Konzentration der Hefe in der Zuckerlösung gemacht wurde. Trockenhefe zeigte das gleiche Verhalten und sie erhielten noch längere Gärungshemmungen, sogar bis zum vollständigen Aussetzen der Gärung. Abderhalden & Fodor[12]) wollen das Zustandekommen der Induktion folgendermaßen erklären:

„. . . Ebensowenig wie Hefeauszüge vermag sterile Hefe (Acetonhefe oder durch Alter sterilisierte Hefe) verdünnte Zuckerlösungen zu vergären, da allen diesen Stoffen die Fähigkeit der Konzentration, die den lebenden Zellen eigen ist, fehlt." Die Verfasser nehmen also an, daß die Induktionsperiode bei der Trockenhefegärung durch Regeneration lebensfähiger, jedoch geschwächter Zellen verursacht wird, was sie weiter dadurch beweisen wollen, daß ein „Vorquellen" der Trockenhefe in Wasser eine erhebliche Kürzung der Induktionsperiode mit sich bringt.

Sobotka[13]) stellte ebenfalls eine Reihe von Versuchen mit Trockenhefe an, um dann die Schlüsse Abderhaldens & Fodors zu bestätigen. Außerdem sieht Sobotka einen weiteren Beweis für seine Auffassung darin, daß vor Beginn der Gärung bereits ein Zuckerschwund aus dem Gärgut stattgefunden hat, den er für das Aufleben der Zellen verantwortlich machen will. Wenn auch die Resultate Sobotkas und Abderhaldens wahrscheinlich auf ein Vorhandensein von lebenden, geschwächten Zellen zurückgeführt werden können, so muß man sich fragen, weshalb Acetonhefe, die nach zahlreichen Untersuchungen von Buchner & Albert[14]), Harden & Young[15]), Euler[16]) u. a. als total entwicklungsunfähig anzusehen ist, dasselbe Verhalten wie die Trockenhefe zeigt. Man muß also mit Harden & Young die Wirkung eines Enzyms annehmen, das unabhängig von der Lebenstätigkeit der Zellen die Gärung hervorruft. Auch die weiteren, sehr interessanten Untersuchungen Abderhaldens[17]) können nicht die obigen Einwände beheben. Abderhalden will jedoch keineswegs die Existenz einer vom Protoplasma unabhängigen Gärung bestreiten, hält jedoch die „Isolierung" der Zymase nicht einwandfrei geglückt und fordert „daß alle das Problem der zellfreien Gärung behandelnden Versuche unter genauer Kon-

trolle der angewandten Präparate auf lebensfähige Zellen durchgeführt werden." Es sei in diesem Zusammenhang erwähnt, daß eine von mir vom Institut für Gärungsgewerbe, Berlin-Seestr., bezogene Trockenhefe (Brauereihefe, untergärige) im frischen Zustande ca. 50% lebende Zellen enthielt (Prüfung mit Methylenblau und Erythrosin), um dann mit der Zeit zu altern (aufgehoben im Eisschrank in einer Blechbüchse) und an lebenden Zellen bedeutend abzunehmen. Die besagte Hefe besaß natürlich, wegen ihres Gehaltes an lebenden Zellen, keine Induktionszeit, obwohl ich bis zu ganz kleinen Hefekonzentrationen hinunterging (vgl. entsprechende Versuche).

Nunmehr folgte eine große Anzahl von Versuchen, die Induktionsperiode bei den Dauerhefen durch die verschiedensten Zusätze zu verkürzen bezw. völlig aufzuheben. Ich möchte vor allem die Untersuchungen von Harden[18]) erwähnen, der nach Zusätzen, wie Natriumacetat, Natriumbikarbonat und Kochextrakt der Trockenhefe, stets eine erhebliche Verkürzung der Induktionszeit konstatieren konnte. Aehnliche Versuche auf weiterer Basis stellten Harden & Macfarlane[19]) an, indem sie sowohl anorganische, wie organische Salze dem Gärgut zusetzten. Das Resultat war, daß abgesehen vom Natriumarsenat die Salze eine mehr oder weniger erhebliche Verkürzung der Induktionszeit verursachten, ohne jedoch dieselbe bei allen Konzentrationen der Hefe zu beseitigen. Die gleichen Forscher erörtern dann die Möglichkeit, daß die Induktion durch ein vorheriges Ansammeln (accumulation) irgendeines für die Gärung notwendigen Stoffes entsteht. Dieses Ansammeln könnte dann wohl durch Salzzusätze irgendwie begünstigt werden.

In neuester Zeit haben Katagiri & Yamagishi[20]) systematische Untersuchungen ausgeführt und haben Anionen- und Kationenreihen für den Wirksamkeitsgrad auf die Induktionsverkürzung aufstellen können.

Neuberg[21]) wies nach, daß die meisten Aldehyde, sowie andere H-Akzeptoren die Gärung mit Mazerationssaft bedeutend beschleunigten. Harden & Henley[22]) konnten Neubergs Ergebnisse auf Zymin ausdehnen.

Eine allgemeine Aufhebung der Induktionsperiode bei den Dauerhefen konnte jedoch, in Analogie zu den oben erwähnten Befunden Meyerhofs, nur durch Hexosediphosphat er-

zielt werden. Harden & Henley[23]) konnten die Ergebnisse Meyerhofs auch bei Zymin bestätigt finden, ebenso Myrbäck, der allgemein die Induktion bei zellfreier Gärung durch Hexosediphosphat aufgehoben fand. Mayer[24]) bestätigte die Meyerhof'schen Versuche bei der Gärung mit Mazerationssaft. Raymond & Levene[25]) fanden, daß nicht nur die natürlichen Hexosephosphate (Hexosediphosphate, Robinsons und Neubergs Monophosphate) sondern auch die synthetischen (3-glucose-, 1-fructose-, 3-fructose- und dihydrooxyaceton Phosphate) eine sehr markante Verkürzung der Induktionsperiode hervorriefen; das Hexosediphosphat übertraf jedoch in seiner Wirkung die anderen Phosphate.

Ueberblickt man die oben angeführten Resultate der verschiedenen Forscher, so erkennt man, daß zweifellos dem Hexosediphosphat eine wichtige Rolle für den Gäranfang zugeschrieben werden muß, denn durch keinen anderen Stoff ist es bis jetzt möglich gewesen, einen vollkommenen Wegfall der Induktion auch bei kleinsten Hefekonzentrationen zu erzielen. Was die Wirkung der Salze usw. anbetrifft, so besteht die Möglichkeit, daß dieselben die Bildung des Hexosediphosphats fördern, sei es durch Aktivierung der Phosphatese oder durch andere Einflüsse und auf diese Art den Gäranfang beschleunigen.

Wir wissen, wie bereits oben erwähnt, daß (vgl. die Harden-Young'schen Gleichungen) das Hexosediphosphat am Anfang der Gärung gebildet und nach Nachlassen bzw. Aufhören derselben wieder gespalten wird. Ausgehend von diesen Gleichungen stellte ich eine Reihe von Versuchen an:

Es wurde eine gewisse Menge Trockenhefe (Inst. für Gärungsgewerbe, vgl. oben) zur Gärung gebracht; nach wenigen Minuten wurde das Gärgut abzentrifugiert und in einen Teil der Flüssigkeit Acetonhefe gegeben und zwar in einer solchen Menge, die stets eine längere Induktionsperiode gezeigt hatte. Das Resultat war, daß sofort eine Gärung erfolgte. Durch einen gleichzeitig ausgeführten Versuch mit dem anderen Teil der Flüssigkeit mit Zucker ohne Hefezusatz, konnte stets festgestellt werden, daß die Gärung ohne Acetonhefe nicht möglich war, also dieselbe nicht durch Bakterien verursacht worden war. Es war, ferner zu ersehen, daß keineswegs die Gärung kräftiger vor sich ging, wenn abzentrifugierte Flüssigkeit benutzt wurde, die durch die Trockenhefe für längere

Zeit in Gärung versetzt worden war. Es wurde nun anstatt der Gärflüssigkeit der Trockenhefe solche von Acetonhefe benutzt, die zu gären angefangen hatte. Das Ergebnis war ein analoges: Die Induktionsperiode der zu der abzentrifugierten Flüssigkeit versetzten geringsten Mengen Acetonhefe wurde sofort aufgehoben. — Es ist wichtig, daß stets die Gärflüssigkeit einer g ä r e n d e n Flüssigkeit genommen wird, da das Gärgut einer Acetonhefe, die noch nicht zu gären angefangen hat, keineswegs eine Induktionsbeseitigung hervorruft.

Benutzt man aber das Gärgut einer Trockenhefe bzw. Acetonhefe, die bereits ausgegoren ist, so wird die Induktionsperiode damit keineswegs völlig aufgehoben. Wie kann man diese Erscheinung erklären? — Da das Gärgut ausgegoren ist, so ist das intermediär gebildete Hexosediphosphat wieder gespalten. Diese Erklärung steht im Einklange mit den Harden-Young'schen Gleichungen und andererseits mit den Ergebnissen der oben erwähnten zahlreichen Forscher, die mit Hexosediphosphat eine vollkommene Beseitigung der Induktion erzielen konnten.

Nach alledem scheint eine Mindestkonzentration an Hexosephosphat für den Gäranfang notwendig. Diese Mindestkonzentration ist äußerst klein (Meyerhof fand 0,2 Millimol), kann jedoch nicht sofort in genügender Menge durch die Phosphatese erzeugt werden, wenn die Konzentration der Hefe in der Gärflüssigkeit zu gering ist. Wird jedoch von außen Hexosediphosphat hinzugegeben, so ist der notwendige Stoff für den Gärungsansatz vorhanden, die Zymase kann nunmehr in Funktion treten und die Gärung geht nach Maßstab der vorhandenen Menge der Hefe und in Abhängigkeit von den anderen Versuchsfaktoren vor sich.

Erwähnt sei noch die interessante Feststellung, daß, wenn man die Acetonhefe mit Wasser für ca. 2 Stunden auf der Schüttelmaschine schüttelt, nach dem Zentrifugieren ein Saft erhalten wird, der eine erhebliche Verkürzung der Induktionszeit erzielt, wenn nach Zusatz von Traubenzucker, geringe Mengen Acetonhefe hinzugegeben wird. Es liegt die Vermutung nahe, daß das Co-Enzym der Zymase, das durch solche Behandlung der Acetonhefe, wohl aus der Zelle austreten kann, für das Verhalten des „Schüttelsaftes" verantwortlich gemacht werden kann.

Eine Störung der von mir beabsichtigten Versuche durch die sog. Induktionsperiode war also bei irgendwie durch Trocknen oder Giftwirkung beschädigter Hefe somit bei Wahl geeigneter Versuchsbedingungen nicht zu befürchten.

2. Aufnahme von Farbstoffen durch Aceton- und Trockenhefe.

H. Schmerl[26]) hat unlängst angegeben, daß bei Gärung mittels Acetonhefe eine Parallelität zwischen Versagen der Methylenblaufärbung und dem Gärbeginn bestehe. Er schreibt: „. . . . Während trockene Acetonhefe sich vollkommen färbte, also keine lebenden Zellen zeigte, versagte die Prüfung, wenn man diese Hefe nach dem Gären mit Methylenblau prüfte. Bei stündlicher mikroskopischer Untersuchung von zum Gären angesetzter Hefe konnte ich dann eine Parallelität zwischen Gärbeginn und Versagen der Färbung feststellen. Auch diese Angaben sind in der Literatur bestätigt. Das Nichteintreten der Methylenblaufärbung bei der einige Zeit in Zuckerlösung sich befindenden Acetonhefe soll aber nicht als Beweis des Wiedereintritts des vollen Lebens der Zellen gelten. Es kann das Ausbleiben der Färbung auch durch den Wiedereintritt der Betätigung eines reduzierenden Fermentes, durch physikalische Veränderung der Zelle oder durch andere Umstände bedingt sein . . . .“ — Ich überprüfte die Angaben Schmerls und kam zum folgenden Resultat: Das Ausbleiben der Methylenblaufärbung gestaltet sich keineswegs so einfach, wie Schmerl gefunden hat. Denn das Versagen der Färbung läuft nicht parallel, sondern vollkommen unabhängig von der Gärung. Benützt man gut gärende Acetonhefe in reichlicher Menge, so ist dies besonders deutlich. Die Gärung geht nach sehr kurzer Zeit flott vor sich, wobei sich noch alle Zellen vollkommen färben. Diese Erscheinung ist keine Eigenart der Acetonhefe, sondern von allen Dauerhefen im allgemeinen. Denn wie ich mich überzeugen konnte, wurden dieselben Ergebnisse auch mit der Trockenhefe (Inst. f. Gärungsgewerbe, vgl. oben) gefunden. R. & W. Albert[27]) haben außerdem vollkommen analoge Befunde bei der Gärung mit Alkohol-Aether-Dauerhefe erhalten. Daß die Erscheinung in keinem Zusammenhang mit der alkoholischen Gärung steht, kann man bewei-

sen, indem man anstatt eines zuckerhaltigen Substrates destilliertes Wasser benützt. Das Resultat ist das gleiche: Mit der Zeit tritt das Versagen der Färbung immer deutlicher zutage, bis schließlich sämtliche Zellen ungefärbt bleiben. R. & W. Albert haben dieselben Resultate erzielt.

Wann das Versagen der Färbung anfängt, hängt vor allen Dingen von der Versuchstemperatur ab. Es besteht in dem von mir untersuchten Temperaturgebiet von 0 –37° eine Beziehung zwischen Temperatur und der Zeit bis zum anfänglichen bezw. vollkommenen Versagen der Färbung mit Methylenblau und zwar so, daß bei steigender Temperatur die erwähnte Zeit verkürzt wird. Die entsprechenden Versuche geben ein deutliches Bild hierüber. Bei 0° ist die Färbung für lange Zeit möglich. Die von Schmerl angegebene Literaturstelle[28]) bezieht sich auf die Wirkung der Reduktase der Hefe. In der üblichen Form ist die Methylenblaufärbung nicht eine Sache der Reduktase, sondern der in der Hefezelle koagulierten Eiweißstoffe. Ob nun die Koagulation durch Hitze (Trockenhefe) oder chemische Mittel erfolgt, ist nebensächlich. Benützt man zur Beobachtung der Erscheinung eine Vergrößerung von ca. 700-fach, so sind die Verhältnisse einwandfreier zu verfolgen. Es handelt sich nämlich nicht um ein plötzliches Versagen der Färbbarkeit bei irgendwelchen Zellen, vielmehr um ein allmähliches Verschwinden derselben. Nimmt man nämlich die Färbung nach gemäß der Versuchstemperatur festzulegenden Zeiten vor, so ersieht man deutlich, abgesehen von ganz wenigen Zellen, wie die ursprünglich vollkommen aufzufärbenden Zellen einen hellen Streifen längs der Zellperipherie aufweisen. Besagter Streifen ist bei späteren Färbungen immer breiter, und dies geht so weit vor sich, bis die ganze Zelle bis auf einen sehr kleinen, hell gefärbten Fleck ungefärbt bleibt. Der Fleck erscheint im mikroskopischen Bilde keineswegs stets in der Mitte der Zelle, sondern ist oft bis zur Membran verschoben. Eine weitere interessante Feststellung ergibt sich bei genauer Beobachtung der Zellen; sie sehen nämlich rings um den Fleck bis zum Zellrande vollkommen leer, d. h. inhaltslos aus. Sehr prägnant tritt dies zutage, wenn man zum Vergleich frische Preßhefe irgendwelcher Art mit Methylenblaulösung versetzt und das mikroskopische Bild betrachtet. Auch hier sind die Zellen ungefärbt; sie zeigen natürlich kei-

nen gefärbten Fleck und sehen überdies vor allem stark lichtbrechend und voll aus. —

Das Versagen der Färbbarkeit ist also darauf zurückzuführen, daß nichts mehr da ist, woran der Farbstoff haften kann. Die ursprünglich vorhandenen, koagulierten Eiweißstoffe werden durch die proteolytischen Enzyme der Hefe abgebaut und diffundieren dann durch die bei Behandlung der Hefe (Trocknung, chemische Mittel) mehr oder weniger beschädigte Membran hindurch. Eine Stütze für diese Auffassung ist der, auch von R. & W. Albert (an Alkohol-Aether-Dauerhefe) erhaltene Befund, daß tatsächlich bei zunehmender Inkubationsdauer der Hefe in dem Gärsubstrat eine zunehmende Menge an Eiweißstoffen in dem Filtrat nachzuweisen ist. Ich untersuchte dies sowohl an Trocken- wie auch an Acetonhefe.

Für den bei den obigen Versuchen beobachteten hellgefärbten Fleck liegt die Vermutung nahe, daß es sich um den Kern der Hefezelle handelt, der wie die zahlreichen Versuche Schuhmachers zeigen, einen anderen chemischen Aufbau als die übrige Zellmasse aufweist.

Es sei kurz erwähnt, daß nicht allein mit Methylenblau, sondern auch mit der Gram-, sowie Erythrosinfärbung u. a. m. die gleichen Ergebnisse erzielt werden.

Interessant war noch die Frage nach der prozentuellen Menge des aus der Zelle diffundierten Zellinhaltes im Vergleich zum Gewicht der gesamten Hefezelle. Zu diesem Zwecke wurden die Versuche mit Zuckerlösung und Trokkenhefe ausgeführt und zwar im genau gewogenen Zentrifugenröhrchen bei 37°. Vorher war der genaue Wassergehalt der benutzten Trockenhefe durch Trocknen bis zur Gewichtskonstanz bei 100° bestimmt worden. Nach ca. 15 Stunden, die wie getrennte Versuche gezeigt hatten, zur vollkommenen Diffusion des Zellinhaltes genügen (bei der von mir gewählten Hefemenge), wurde das Hefe-Zucker-Gemisch zentrifugiert und durch wiederholtes Zentrifugieren mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach erfolgte die Trocknung bei 100° bis zur Gewichtskonstanz. Als Mittel von vier miteinander gut übereinstimmenden Werten erhielt ich einen Gewichtsverlust von 67,6%.

Hiermit hat die Nichtfärbbarkeit toter, gärender Hefezellen nach der Gärung eine Aufklärung gefunden, die zu-

gleich irgendwelche Störungen bei der von mir beabsichtigten Prüfung der Vitalität von Hefezellen mit Hilfe der Färbung ausschloß.

3. Brauchbarkeit der Farblösungen zur Unterscheidung von frischer und toter Hefe.

Für die Versuche im letzten Abschnitt dieser Arbeit war es notwendig, eine zuverlässige und möglichst bequeme Methode zu finden, um die ungefähre prozentuale Menge der abgetöteten Hefezellen zu bestimmen. Betrachtet man die sporenbildenden bezw. sich vermehrenden Hefezellen als „lebend" und die übrigen als „tot", so könnte man wohl die jeweilige Hefezellenmenge durch mikroskopische Auszählung der Zellen mit den Hefezählapparaten (z. B. den Zeiß'schen Zählkammern) bestimmen, aber diese Methode ist recht unbequem, erfordert große Uebung und ist dennoch nicht vollkommen sicher, da die Annahme, daß Zellen, die keine Sporenbilder sind, als „tot" zu betrachten sind, experimentell nicht bewiesen werden kann. Eine andere Methode ist die Färbung der Zelle mittels Farbstoffe wie z. B. Methylenblau. Diese Art der Bestimmung der Anzahl von „lebenden" und „toten" Zellen wird in den Betriebslaboratorien meist angewandt und zwar unter Zuhilfenahme von Methylenblaulösung 1:10000. In neuerer Zeit sind ausführlichere Arbeiten auf diesem Gebiet ausgeführt worden, indem die Zuverlässigkeit der einzelnen Farbstoffe für die Zellfärbung untersucht wurde. Lindner[29]) weist darauf hin, daß nicht nur Methylenblau sondern auch jede andere Anilinfarbe wie Fuchsin, Gentianaviolet, Bismarkbraun sich zum Nachweis toter Zellen eignen. Fuchs findet, daß bei Benützung von Methylenblaulösung 1 : 10 000 die schwächer gefärbten Zellen noch Sproßvermögen besitzen, während die stark gefärbten tot sind. Fink und Weinfurtner[30]) behandeln die Methylenblaufärbung sehr eingehend und kommen zur Erkenntnis, daß verschiedene Faktoren für die Färbbarkeit der Zellen maßgebend sind, so z. B. die Vorbehandlung der Zellen, das P_h der Lösung und Salzgehalt derselben. Die Forscher finden es sogar notwendig, daß Resultate bei wissenschaftlichen Arbeiten, die mit der Methylenblaumethode im Vertrauen auf ihre absolute Zuverlässigkeit erhalten worden sind, nachgeprüft werden. Diese

Forderung der Verfasser ist wohl berechtigt, wenn absolute Angaben über die Zahl der toten und lebenden Zellen gemacht werden, nicht aber, wenn es nur darauf ankommt, wie es oft der Fall ist, im Laufe eines Versuches die relative Zunahme der toten Zellen zu bestimmen. Bei dieser Art von Versuchen, werden ja die Färbungen unter gleichen Bedingungen vorgenommen und prozentuelle Angaben können gut angeführt werden.

Fraser[31]), Schlichting[33]), Devreux & Tanner[32]), haben eine große Anzahl von Farbstoffen auf ihre Brauchbarkeit für die Hefezellfärbung untersucht. Die Letztgenannten finden unter den untersuchten Farbstoffen an erster Stelle Erythrosinlösung (0,5%ig) und dann Methylenblaulösung (1:1000) besonders zuverlässig für die Färbungen. Ich überprüfte die Angaben von Devreux & Tanner für Erythrosin- und Methylenblaulösung und konnte bestätigen, daß diese beiden Farbstoffe tatsächlich gute Resultate ergeben. Erythrosinlösung (0,5%ig) war aber insofern geeigneter für die Färbung, weil ich beobachtet hatte, daß Hefezellen bei mikroskopischer Betrachtung in manchen Lagen Lichtbrechung hervorrufen und eine hellblaue Färbung vortäuschen. Bei Benützung von Erythrosinlösung braucht dieser Umstand nicht beachtet zu werden.

Ich glaube in diesem Zusammenhange erwähnen zu können, daß Brandrup[34]) für die Unterscheidung zwischen gärfähigen und nicht gärfähigen Hefesorten (speziell: medizinische und bei 110° erhitzte Hefe) „Neutralrot nach Ehrlich von Grübler zur Injektion in vitales Gewebe" empfiehlt. Die gärtüchtigen Hefezellen sollen sich ganz schwach rosa färben, wobei Membran und Zellkern sich weiß leuchtend abheben. Dagegen sollen sich bei nicht gärfähigen Zellen fast sämtliche Zellen durchweg rot färben, ohne leuchtende Zellkerne und Membrane erkennen zu lassen. Ich konnte leider trotz vieler Versuche und unter Benützung der vollkommen gleichen Hefesorten sowie Farblösung keine Bestätigung der Angaben finden.

4. Angeblicher Zuckerschwund vor Beginn der sichtbaren Gärung.

Wertheimer[35]) hat die Beobachtung mitgeteilt, daß ein großer Teil des Zuckergehaltes einer durch Hefe in Gärung

versetzten Gärlösung verschwindet, bevor eine Gärung stattgefunden hat. Seine Versuche sind an frischer, sowie Trockenhefe angestellt worden. Er stellt durch seine Versuche fest, daß vermutlich der Zucker zu einem polymerisierten Glykogen, oder Glykogen, das an einem anderen Körper physikalisch oder chemisch gebunden ist, umgebildet wird. Es gelingt ihm nicht den Körper zu isolieren oder den Zukkerverlust quantitativ durch das nachgewiesene Glykogen zu erklären. Bei seinen Versuchen mit Trockenhefe konnte er auch die Bildung eines, dem Glykogen verwandten Körpers feststellen, aber war die prozentuelle Menge derselben geringer als bei Benützung von frischer Hefe. Sobotka[36]) hat auch bei seinen Untersuchungen über Trockenhefe ein Zuckerdefizit bis zu 50% feststellen können. Sobotka betrachtet dies als ein weiterer Beweis für seine Auffassung über die Natur der Trockenhefegärung. Er führt aus: „Da der verschwundene Zucker offenbar dem inneren Stoffwechsel der Zelle dient, so kann der Mehrverbrauch bei den Trockenhefen hinreichend mit deren besonderen Bedürfnissen der Ergänzung des oft sehr geringen Glykogengehaltes, insbesondere aber mit dem Substanzbedarf zum Aufbau der von Abderhalden festgestellten sprossenden Tochterzellen erklärt werden."

Diese Erklärung Sobotkas würde eine starke Stütze für seine Auffasung der Trockenhefegärung bedeuten. Ich hielt es daher für meine Aufgabe, die von mir benützte Trockenhefe in dieser Hinsicht zu prüfen. Ich brachte eine gewisse Trokkenhefemenge in eine Traubenzuckerlösung und pipettierte einen Teil in das Gärgefäßchen des Warburg-Barcroft-Manometers. Ich konnte dann die einfache Beobachtung machen, daß dasjenige Gefäßchen, das nicht geschüttelt wurde, eine Induktion vortäuschte, während das dauernd geschüttelte Gefäßchen vom Anfang an eine Gärung anzeigte. Unterbricht man das Schütteln, so hört sofort die CO_2-Entwicklung auf. Bringt man das Gefäßchen, das zuvor nicht geschüttelt wurde, in Bewegung, so ersieht man, wie die CO_2-Entwicklung sofort anfängt. — Aehnliche Versuche stellte ich mit Acetonhefe an. Das Ergebnis war hierbei, daß das Schütteln für die Dauer der Induktionsperiode unwesentlich ist, wohl aber für die Erkennung des Anfanges der Gärung. Aus alledem geht hervor, daß man leicht die Induktionsperiode verkennen, d. h. den Gäranfang verpassen kann, wenn nicht die ganze Zeit hin-

durch das Gefäß mit dem Gärgut geschüttelt wird und genaue Bestimmungsmethoden benützt werden. Wird das Gefäß nicht geschüttelt, so wird das gebildete CO_2 in der stark eiweißhaltigen Lösung zurückgehalten. Außerdem kann das anfänglich gebildete CO_2 an der Zelloberfläche haften bleiben und hierdurch eine Zeitlang das weitere Eindringen der Zuckerlösung in die Zelle verhindern. Die Induktionsperiode erscheint dann länger als sie in Wirklichkeit ist. Untersucht man dann gegen Ende der vermeintlichen Induktionszeit das Gärgut, so ist ein Teil des Zuckers des Substrates verschwunden, ohne daß eine CO_2-Bildung ersichtlich ist. Dieser Umstand verdient bei solchen Versuchen mit Trocken- oder Acetonhefe genauestens beachtet zu werden, da sonst die Angaben mit großer Vorsicht behandelt werden müssen. Bei meinen Versuchen um festzustellen, ob auch bei Acetonhefe ein Zuckerdefizit entsteht, ohne entsprechende Gärung ergab sich, daß dies keineswegs der Fall ist. Die nach der Bertrandschen Methode gefundenen Zuckerwerte waren bis zum Anfang der Gärung innerhalb der Versuchsfehler vollkommen gleich. Diese Befunde sprechen dafür, daß die Induktionsperiode nicht durch ein „Aufleben" der Hefezellen, im Sinne Sobotkas verursacht werden kann; denn man müßte sonst auch bei Acetonhefe einen Zuckerverlust während der Induktion feststellen können. Die Befunde Sobotkas und Wertheimers können vielleicht durch Wahl ungünstiger Versuchsbedingungen zustande gekommen sein, so z. B. indem das Gärgut nicht von Anfang an fortwährend kräftig geschüttelt wurde, so daß die wahre Induktionszeit nicht erkannt worden ist.

II. Einwirkung von Giftstoffen auf die lebende Hefezelle.

1. Beeinflussung der Gärkraft der Hefe.

Wir wissen, vor allen durch die vielseitigen Untersuchungen von Th. Sabalitschka[37]) und seinen Mitarbeitern, daß den Estern der p-Oxybenzoesäure eine stark bakterizide Wirkung zukommen. Diese Ester haben auch Eingang in die Praxis gefunden durch Anwendung als Konservierungsmittel usw. Die Frage war daher von großem Interesse, wie sich diese Stoffe zur alkoholischen Hefegärung verhalten, oder anders ausgedrückt, wie die alkoholische Gärung durch sie beeinflußt

wird. Es sind zwar viele solche Versuche angestellt worden, dennoch gibt es sehr wenige Arbeiten, die dieses Thema ausführlicher behandeln; auch sind die gewählten Untersuchungsmethoden oft nicht derart genau, daß die Resultate als restlos zuverlässig betrachtet werden können. Erst seitdem die Warburg'sche Methode der Stoffwechseluntersuchung bei Zellen uns eine sehr genau arbeitende Apparatur geliefert hat, ist es möglich geworden, Ergebnisse zu erzielen, die leicht reproduziert und durchaus anerkannt werden können. Die Beschreibung, sowie Arbeitsweise der Apparatur habe ich im experimentellen Teil ausführlich behandelt, sodaß es sich erübrigt, darauf an dieser Stelle einzugehen.

Die chemischen Substanzen werden dann zu Hefegiften, wenn es gelingt, sämtliche Lebensfunktionen der Hefezelle zu unterbinden. Diese Aufgabe ist jedoch sehr schwierig; denn die Frage lautet nun: Welche sind die Lebensfunktionen der Hefezelle? — Wie klar auch die Fragestellung ist, kann die volle Antwort nicht gegeben werden. Wir kennen zwar einige Funktionen der Hefezelle, vor allen die Gärung, Atmung und Sprossung, aber es ist keineswegs entschieden, daß diese Funktionen außer der letzten ausschließlich mit dem Leben der Zelle zusammenhängen. Acetonhefe gärt, ohne auch nur wenige lebende Zellen zu enthalten. Was die Atmung anbetrifft, so gilt das gleiche; wissen wir doch durch die ausführlichen, genauen Untersuchungen Meyerhofs[38]), daß Acetonhefe eine bestimmte Atmungsgröße besitzt. Der genannte Forscher hat sogar einen „Atmungskörper" feststellen können, sodaß es sehr fraglich ist, ob wir überhaupt bei Hefe von einer Atmung oder einem enzymatischen Oxydationsvorgang sprechen können. Nun kommen wir zur Sproßfähigkeit der Hefe. Aus der Unfähigkeit, sich zu vermehren, können keineswegs Schlüsse in bezug auf Lebensfähigkeit der Zelle gezogen werden; denn es ist einleuchtend, daß eine Zelle, die nicht sproßt, dennoch sehr wohl leben kann.

Ich glaube mit den obigen Ausführungen klargelegt zu haben, wie unvorsichtig es ist, etwa von einer Giftwirkung im wahrsten Sinne des Wortes zu sprechen, wenn man nur die eine oder die andere Funktion der Hefezelle vollauf unterbunden hat. Aber selbst wenn die eine oder die andere Funktion der Zelle als dem Leben derselben zugehörig erwiesen wird, so muß immer noch stets gezeigt werden, daß das

betreffende „Gift" eine dauernde, vollständige Zerstörung der betreffenden Lebensfunktionen hervorgerufen hat. Der Versuch würde sich etwa so stellen, daß nach vollkommener Entfernung des Giftstoffes die Hefe in eine Umgebung mit günstigen Nährverhältnissen gebracht und festgestellt wird, ob die betreffende Funktion wieder in Erscheinung tritt oder nicht; aber es läßt sich kein berechtigtes Maß für das Verweilen in der gesunden Umgebung angeben, sodaß auch solche Versuche nichts absolutes aussagen würden.

Aus alledem ersieht man, daß der Begriff „tot" bei Mikroorganismen nicht exakt bestimmbar ist. Es ist dennoch von großem Interesse eine Reihe chemischer Agenzien in ihren Wirkungen auf eine bestimmte Funktion der Hefe zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. In dem vorliegenden Abschnitt meiner Arbeit untersuchte ich die Wirkung einer Reihe von teilweise naheverwandten Stoffen auf die alkoholische Gärung der lebenden Hefe und stellte an Hand der Ergebnisse Hemmungskurven für die einzelnen Stoffe dar.

Sehr wichtig ist es bei solchen Versuchen die richtige Wahl der Hefemenge und der Hefeart zu treffen. Es hat sich nämlich vor allem gezeigt, daß, wie Will[39]) zuerst nachgewiesen hat, bei gegebener Giftmenge und Giftkonzentration die hemmende Wirkung von der anwesenden Hefemenge abhängig ist und zwar so, daß die Giftwirkung und Hefemenge in umgekehrter Beziehung zueinander stehen, d. h. daß die Giftwirkung um so stärker ist, je weniger Hefe sich in der Lösung vorfindet. Demnach ist das Verhältnis von Giftmenge zu Hefemenge (natürlich in gewissen Grenzen) mitbestimmend für die Größe der Giftwirkung.

Was das Zustandekommen der Giftwirkung als solche anbetrifft, so sind hierfür die verschiedensten Ansichten vertreten. Ich greife einige derselben heraus. W. Ostwald[40]) hat zuerst gezeigt, daß der Verlauf der Vergiftungskurven sich mit der Annahme, daß primär eine Absorption des Giftes stattfindet, gut vereinbaren läßt. Czapek[41]) kommt zu dem Schluß, daß die chemische Natur der Stoffe unwesentlich für die Giftwirkung sei, wohl aber die Oberflächenspannung, die sie in wässriger Lösung hervorrufen. Die besagte Oberflächenspannung soll eine Exmose des Zellinhaltes verursachen, sodaß die Zelle vergiftet wird. I. Traube[42]), der die unten angeführte Theorie von Overton anficht, ist der Auffassung,

daß der „reziproke Haftdruck die treibende Kraft der Osmose ist." Unter Haftdruck oder Haftintensität versteht er die Anziehung zwischen dem betreffenden Stoff und dem Lösungsmittel (z. B. Wasser oder Alkohol). In der Begründung seiner Haftdrucktheorie führt Traube[43]) weiter aus, daß „je geringer der Haftdruck eines Stoffes im Wasser ist, um so mehr konzentriert sich somit derselbe nach Gibbs Prinzip an der Grenze zweier Phasen, um so größer ist vielfach die Tendenz, sich in der benachbarten Phase zu lösen, in dieselbe hineinzudiosmieren, oder sich von einer zweiten, etwa festen Phase absorbieren zu lassen." Als ein annäherndes Maß für die Oberflächenaktivität (bezw. des Haftdruckes) gibt Traube die Oberflächenspannung (nämlich der Lösung des Mittels gegen Luft) an, und zwar stehen sie im umgekehrten Verhältnisse zueinander, allerdings unter der Bedingung, daß es sich nicht um flüchtige Stoffe (wie z. B. Chloroform) handelt. Je größer die Oberflächenaktivität um so kleiner ist der Haftdruck. Hiermit ergibt die Bestimmung der Oberflächenspannung ein direktes Maß für die Leichtigkeit des Eintritts des Giftstoffes in die Zelle.

Da erwiesenermaßen in der Hefezelle Lipoide vorhanden sind, die organische, fettartige Substanzen darstellen, nahm Overton[44]) an, daß die Lipoidlöslichkeit ein Maß für die Geschwindigkeit des Durchganges durch die Plasmahaut geben könnte.

Es läßt sich sagen, daß die Lipoidtheorie allgemeiner gültig ist, als die Haftttheorie; denn eine Reihe sehr oberflächenaktiver Stoffe wie Eiweißarten, Albumosen, Peptone, Gummiarabikum usw. dringen nicht in die Zelle hinein. Die kolloidale Natur dieser Stoffe kann nicht hierfür verantwortlich gemacht werden, wohl aber der Mangel an Lipoidlöslichkeit; dagegen permeieren andere kolloidal gelöste Stoffe wie einzelne Farbstoffe u. a. in die Zelle, da sie lipoidlöslich sind.

Es sollte eine Anzahl chemischer Stoffe aus der aromatischen Reihe auf die alkoholische Gärung der Hefe zur Einwirkung kommen und die Beeinflussung der Gärung durch Hemmungskurven dargestellt werden. Außerdem werden in weiteren Abschnitten der Arbeit auch die Wirkungen der betreffenden Stoffe auf Atmung neben Gärung zugleich, sowie auf das Plasma der Hefe durch Versuche bestimmt.

Die Einwirkung von „giftigen" Stoffen auf die alkoholische Gärung der lebenden Hefe wurde schon längst von Schulz & Biernacki[45]) untersucht. Weitere Studien wurden unter anderen durch Grigoriew & Gronow[46]), Duchacek[47]), Joachimoglu[48]), Zeller[49]), Bokorny[50]), sowie Kostychew und Berg[51]) und Rolf Meier[52]) ausgeführt. Die beiden erstgenannten Forscher haben außer einer Giftwirkung auch eine Stimulierung der Gärung durch Verwendung geringer Mengen chemischer Substanzen feststellen können. Interessant ist die Arndt-Schulz-Regel: Kleine „Reize" regen die Lebenstätigkeit an, große hemmen oder heben sie auf. Rolf Meier weist darauf hin, daß die Regel nicht nur unklar ist, sondern auch einer sicheren Grundlage entbehrt; denn man dürfe nicht lediglich eine Funktion der Zelle untersuchen und Rückschlüsse auf die „Lebenstätigkeit" der Zelle ziehen, ohne überhaupt zu wissen wie die anderen Lebensfunktionen beeinflußt werden. Der Forscher wählt als Untersuchungsobjekt Stoffe, die auch Schulz benützt hatte und beweist durch genaues Studium der Atmung und Gärung der lebenden Hefe mit dem Warburg-Barcroft-Manometer, daß die Atmung der Zelle niemals stimuliert wird, was wohl zu erwarten wäre, wenn tatsächlich eine Anregung der „Lebenstätigkeit" als solche stattgefunden hätte. Auch durch die Experimente von Joachimoglu und Heubner wird die Allgemeingültigkeit der Arndt-Schulzschen Regel in Frage gestellt, selbst wenn man anstatt „Lebenstätigkeit" „Gärung" setzt. Auch ich habe keine Bestätigung des Satzes gefunden, obwohl ich bei jedem Stoff bis zu sehr niedrigen Konzentrationen hinunterging und eine recht empfindliche Untersuchungsmethode anwandte. Wie aus dem experimentellen Teil hervorgeht, erzielte ich eine Reizwirkung auf die alkoholische Gärung nur bei der Salicylsäure und dem Propylester der Paraoxybenzoesäure. Im Gegensatz zu Schulz & Biernacki, aber in Uebereinstimmung mit Rolf Meier konnte ich bei Phenol keine Stimulierung der Gärung erreichen.

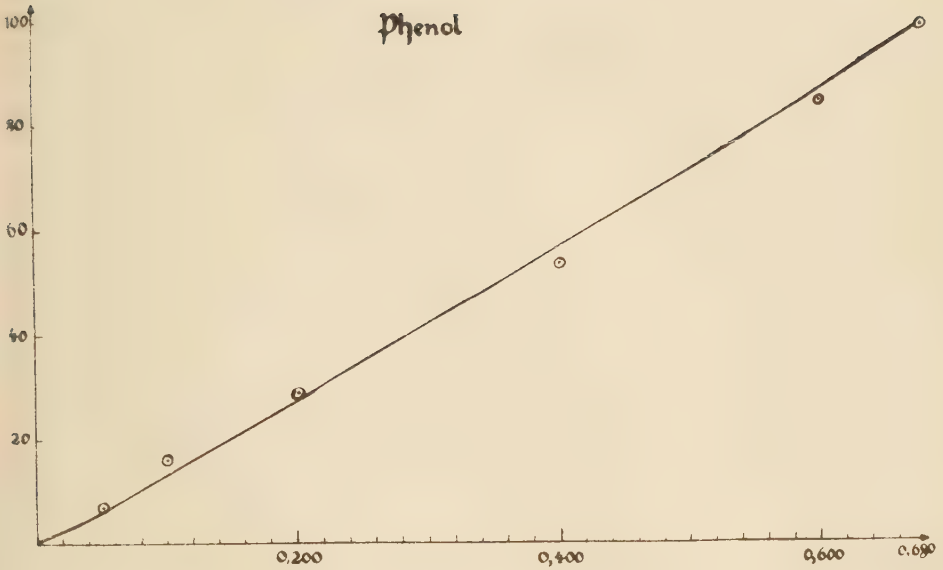
Man kann wohl sagen, daß an Hand der bisherigen Forschungen die Arndt-Schulz'sche Regel auf keinen Fall allgemeingültig ist, auch dann nicht, wenn man, speziell für die Hefe anstatt „Lebenstätigkeit" „Gärung" setzt. Daß eine Anzahl Giftstoffe wie Strychnin, Kupfersulfat, Acetaldehyd u. a. m. bei geringen Konzentrationen eine Anregung der

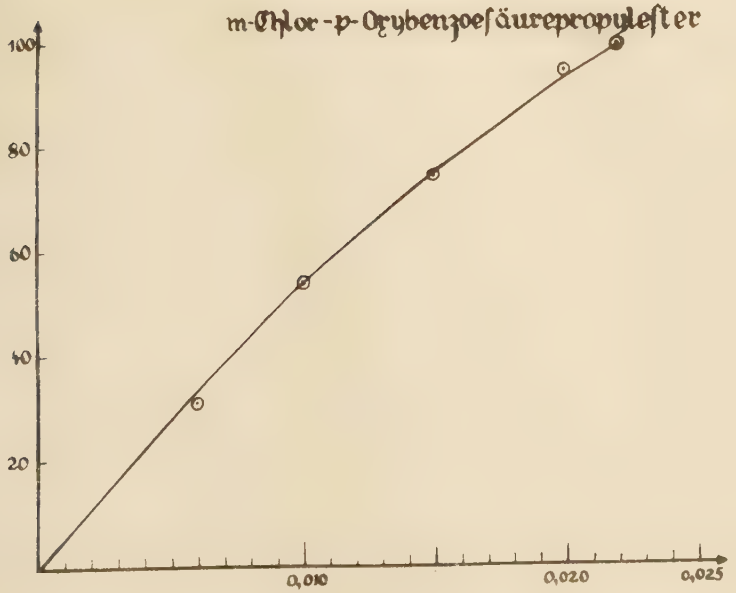
Gärung verursachen, berechtigt nicht zur Aufstellung irgendeiner Regel.

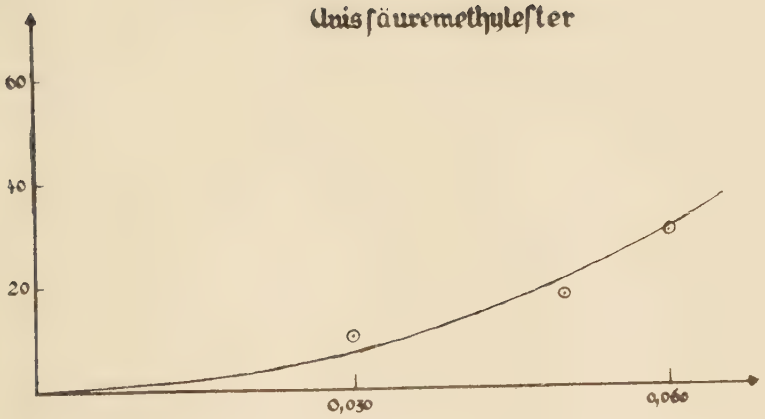
Sehr wichtig ist meines Erachtens bei solchen Versuchen zur Bestimmung der Gärungshemmung die richtige Wahl der Hefesorte. Zunächst ist es natürlich am besten mit Reinzuchthefe zu arbeiten. Agarkulturen derselben können vom Institut für Gärungsgewerbe, Berlin, bezogen werden. Neben der Gärung geht bei der Hefezelle auch eine Atmung vor sich. Bei dieser wird Sauerstoff aufgenommen und Kohlendioxyd abgegeben. Das Volumenverhältnis dieser beiden Gase (der sog. respiratorische Quotient) schwankt zwischen 0,7—1,0. Bei kleiner Atmung im Vergleich zur gemessenen Gärung würde es prozentual eine geringe Rolle spielen, wie groß die Abweichung des respiratorischen Quotienten von 1,0 ist, nicht aber, wenn man eine stark atmende Hefe benutzen würde. Außerdem ist es an und für sich günstig wegen der unten erwähnten Wechselwirkung zwischen Atmung und Gärung eine Hefe zu gebrauchen, deren Stoffwechselenergie hauptsächlich der Gärung entstammt, die Atmung also fast ausgeschaltet ist. Aus diesen beiden Gründen wählte ich die Heferasse U. Dies ist eine untergärige Brauereihefe. Nach den exakten Untersuchungen Meyerhofs[53]) sowie Trautweins & Wassermanns[54]) hat sich nämlich gezeigt, daß die extremste Stelle in bezug auf Kleinheit der Atmung im Vergleich zur Gärung eben die untergärigen Brauereihefen einnehmen. Die genannte Heferasse bildet also ein geeignetes Objekt für die Gärungsversuche.

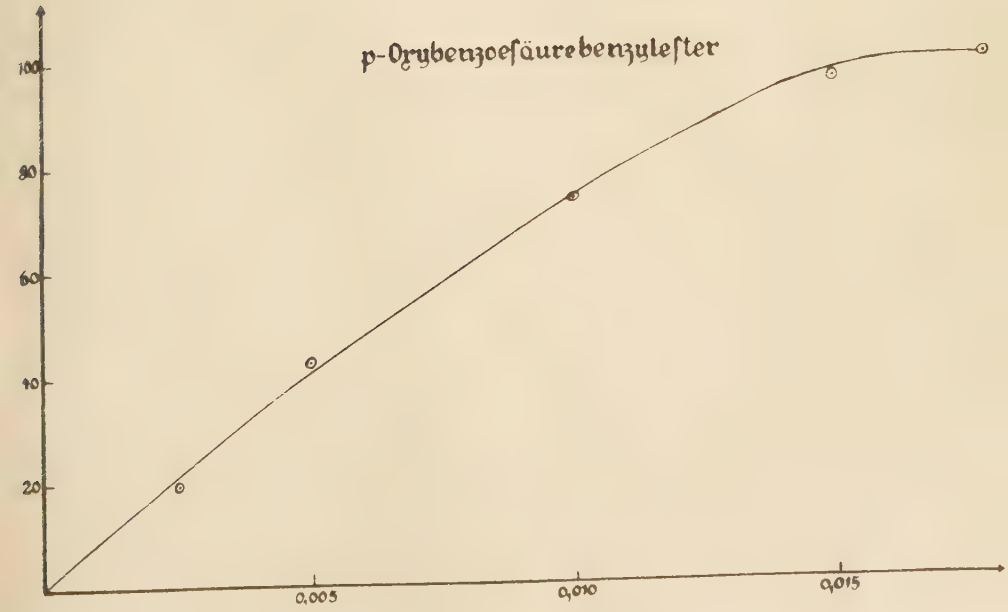
Die in dem experimentellen Teil angeführten Resultate, die den Einfluß der Giftkonzentration auf die Gärung verdeutlichen, sind in Form von „Hemmungskurven" in den Abbildungen dargestellt. In denselben sind stets auf der Ordinate die prozentuale Hemmung, d. h. der prozentuale Gärungsbetrag, der im Vergleich zum Versuche ohne Giftstoff verschwunden ist (vgl. experimentellen Teil S. 41) und auf der Abzisse die Konzentration des Giftstoffes in Prozenten angegeben.

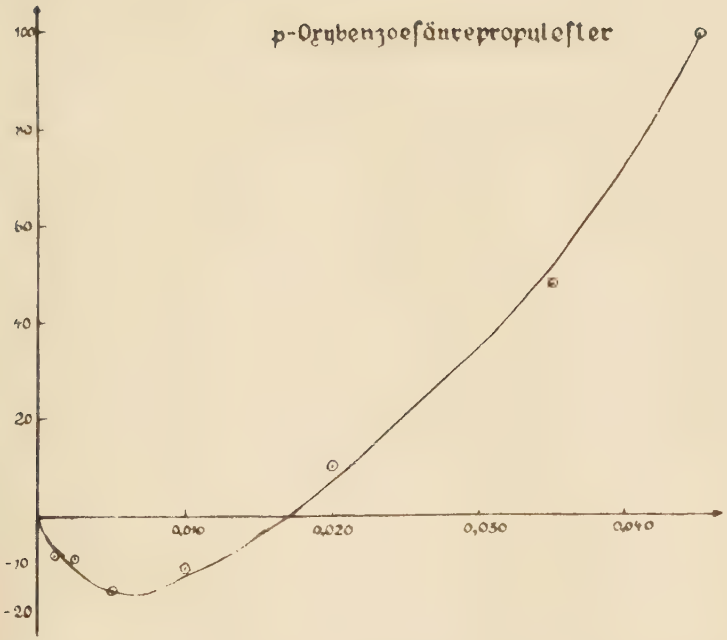
Stellen wir mittels der Ergebnisse für 100%ige Gärungshemmung eine Wirksamkeitsreihe auf, so ergibt sich folgende Tabelle:

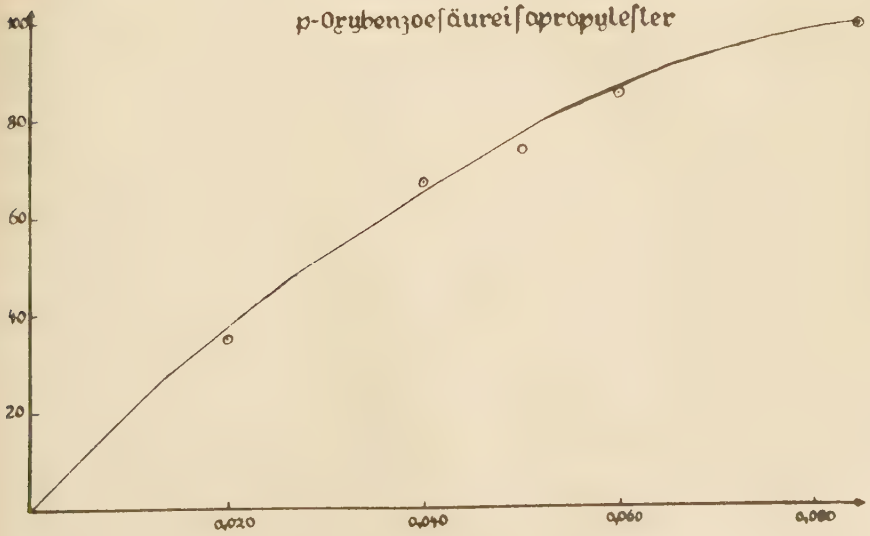

Phenol
100
80
60
40
20
0,200
0,400
0,600
0,690

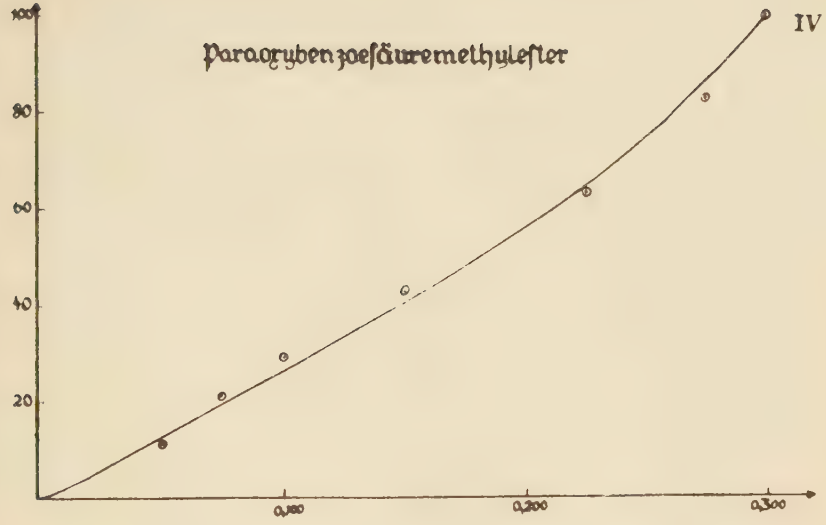

m-Chlor-p-Oxybenzoesäurepropylester
100
80
60
40
20
0,010
0,020
0,025

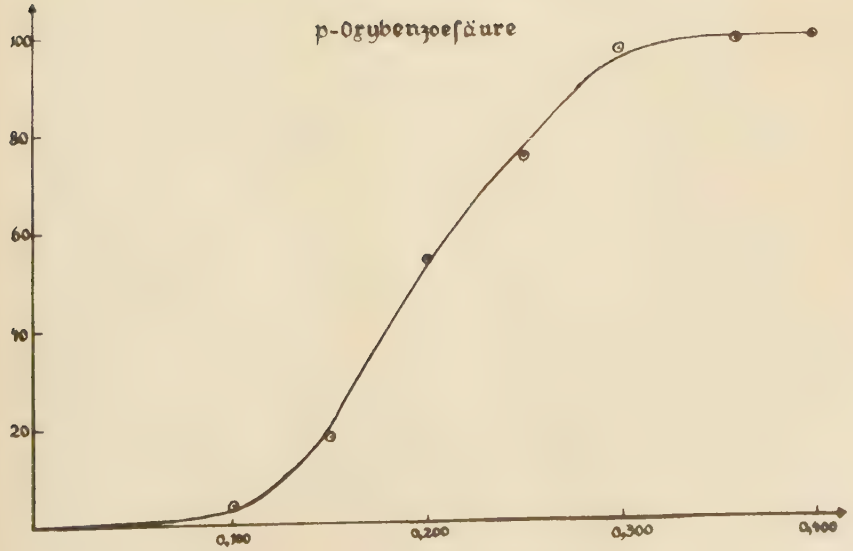

Anisſäuremethyleſter
60
40
20
0,030
0,060

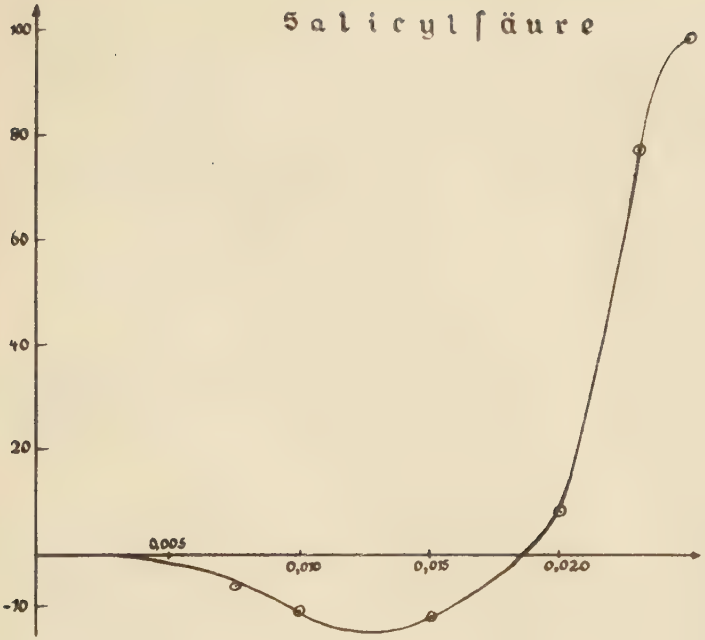

p-Oxybenzoeſäurebenzyleſter
100
80
60
40
20
0,005
0,010
0,015

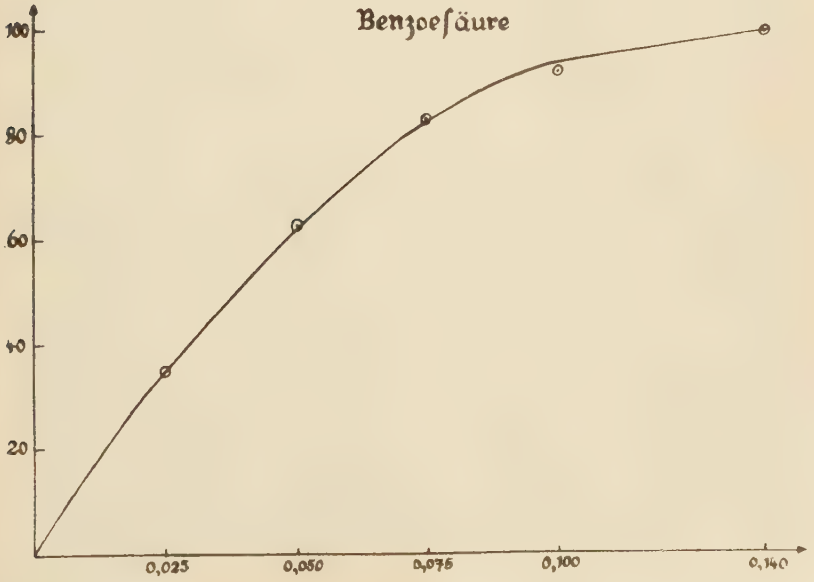

p-Oxybenzoesäurepropylester
100
80
60
40
20
-10
-20
0,010
0,020
0,030
0,040


p-Oxybenzoesäureisopropylester
100
80
60
40
20
0,020
0,040
0,060
0,080


Paraoxybenzoesäuremethylester
100
80
60
40
20
0,100
0,200
0,300


p-Oxybenzoesäure
100
80
60
40
20
0,100
0,200
0,300
0,400


Salicylsäure
100
80
60
40
20
-10
0,005
0,010
0,015
0,020


Benzoesäure
100
80
60
40
20
0,025
0,050
0,075
0,100
0,140

Gruppe I.

Substanz	Proz.Lsl.kt. im H_2O-18° C.	Molek.-gewicht	Proz.Konz. f.100%ige Gärhemmg. - 28° C.	Millimol im Liter
p-Oxybenzoesäure-benzylester .	0,01(2)	228	0,018	0,8
„ -chlorpropylester	0,01(6)	214	0,022	1,0
„ -propylester .	0,06	180	0,045	2,5
„ -isopropylester	0,10	180	0,085	4,7
„ -methylester .	0,25	152	0,300	19,7
„	0,60	138	0,400	29,0

Gruppe II.

Salicylsäure	0,25	138	0,025	1,8
Benzoesäure	0,33	122	0,140	11,5
Phenol	6,66	90	0,680	75,6

Werfen wir einen Blick auf die Hemmungskurven, so zeigen sie uns meist in ihrem anfänglichen Verlauf eine fast direkte Proportionalität zwischen Giftstoffkonzentration und prozentueller Hemmung. Bei Annäherung an die Mindestkonzentration für 100%ige Gärungshemmung steigt die hemmende Wirkung viel langsamer als die Konzentration. Dies zeigt sich besonders deutlich bei einzelnen Kurven durch eine Abflachung gegen Ende des Kurvenastes.

Die allgemeine Regelmäßigkeit der Kurven läßt vermuten, daß die gärhemmende Wirkung der Stoffe gesetzmäßig verlaufen muß.

Nur bei der Salicylsäure und dem p-Oxybenzoesäure-propylester ist eine Reizwirkung, d. h. eine Stimulierung der Gärung bei niedrigen Giftkonzentrationen ersichtlich. Die Reizwirkung ist als negative Hemmung aufgezeichnet worden.

Bei dem Anissäuremethylester konnte eine noch größere hemmende Wirkung als 30% nicht erreicht werden, da die höheren Giftkonzentrationen als 0,06% nicht mehr stabil waren.

Bei der obigen Tabelle ist uns vor allen Dingen folgendes auffallend: In jeder der beiden Gruppen I und II, wo miteinander verwandte Substanzen eingeordnet sind, erkennen wir, daß bei steigender Löslichkeit die Mindestkonzentration für 100%ige Hemmung der Gärung zunimmt. Andererseits finden wir eine reziproke Beziehung zwischen Molekulargewicht und

der Mindestkonzentration; eine Ausnahme bilden die Propylester, die trotz gleichen Molekulargewichts verschiedene Mindestkonzentrationen aufweisen. Wir erkennen also, daß auch die chemische Konstitution der Stoffe mitbestimmend für die Giftwirkung ist. Dies tritt auch beim Vergleich der beiden Oxybenzoesäuren zutage.

Ohne die Geltung der Overton'schen Lipoidtheorie an dieser Stelle prüfen zu wollen, möchte ich erwähnen: Der Grad der Wirksamkeit einer Substanz als Giftstoff ist nach Overton gegeben durch $\frac{\text{Löslichkeit in Oel.}}{\text{Löslichkeit in } H_2O.}$ Je größer derBruch, um so wirksamer ist also der Stoff. Haben wir nun eine kleine Wasserlöslichkeit, so ist von vornherein eine günstige Vorbedingung für einen großen Wirkungsgrad gegeben. Wir sehen, daß dies bei den beiden Gruppen, jede für sich betrachtet, tatsächlich zutrifft.

Es sei in diesem Zusammenhang erwähnt, daß Pi-Suner[55]) bei seinen Versuchen für p-Oxybenzoesäurepropylester eine Mindestkonzentration von 0,06% und bei der Benzoesäure 0,10% für 100%ige Gärungshemmung gefunden hat. Bei der Salicylsäure soll die Mindestkonzentration jedoch 0,08% sein. Pi-Suner benutzt eine obergärige Brennereihefe Rasse XII (Institut f. Gärungsgewerbe, Berlin). Die obergärigen Brennereihefen besitzen eine starke Atmung, sind also wie oben erwähnt, ungeeignet für Gärversuche und außerdem sind jene Versuche im Einhorn-Röhrchen ausgeführt, sodaß die Resultate als grob bezeichnet werden müssen.

Zum Schluß möchte ich noch erwähnen, daß die interessante, anregende Wirkung einzelner chemischen Substanzen auf die Gärung bei dem heutigen Stande der Wissenschaft noch keineswegs auch nur ein wenig erklärt werden kann. Immerhin ist folgende Auffassung Eulers & Lindners[56]) bemerkenswert: „Beim Eindringen von Protoplasmagiften in die Zellen sucht die Zelle zunächst das Gift mit ihren normalen Mitteln zu beseitigen. Tritt mehr Gift in die Zelle ein, als unter normalen Verhältnissen gebunden oder zerstört werden kann, so sucht die Zelle genügende Mengen des neutralisierenden Stoffes oder eines Oxydationskatalysators zu produzieren und dadurch ihr Plasma unbeschädigt zu erhalten. Mit dieser gesteigerten Produktion von Schutzstoffen oder Oxydations-

mitteln ist bis zu einem gewissen Punkt eine allgemeine Steigerung der Lebensprozesse verknüpft. Dringen hingegen noch weitere Giftmengen in die Zelle ein, so kann auch bei erhöhter Lebenstätigkeit das Protoplasmagift nicht mehr neutralisiert komplex gebunden oder verbraucht werden, und eine Schädigung der Zelle muß die Folge sein."

2. Beeinflussung der Atmung der Hefe im Vergleich mit der gleichzeitigen Beeinflussung ihrer Gärkraft.

Im vorigen Abschnitt behandelten wir die Wirkung einer Anzahl chemischer Substanzen auf die alkoholische Gärung der Hefe unter fast vollkommener Ausschaltung der Atmung. Dies geschah durch Benutzung einer besonderen Heferasse. Wollen wir nunmehr Atmungsversuche ausführen, so müßten wir ebenfalls eine Hefesorte wählen, bei der die Gärung im Vergleich zur Atmung verschwindend klein ist. Eine solche Hefesorte gibt es (vgl. Meyerhof[57]). Es handelt sich um die Torula (Mykoderma), die aber indes keine Kulturhefe, sondern eine wilde Heferasse darstellt. Die Anwendung einer solchen Hefe schien mir insofern unangebracht, da man schwerlich berechtigt ist, die mit dieser wilden Heferasse erhaltenen Resultate mit denen der bei den Gärversuchen benutzten Kulturhefe zu vergleichen, was ich aber gerne getan hätte. Es blieb nichts anderes übrig, als bei den Kulturhefen zu bleiben. Ich wählte daraufhin eine Hefesorte, die in bezug auf die Atmungsgröße in der Mitte der Reihe steht. Es ist die Preßhefe (Bäckereihefe). Bei ihr sind Atmung und Gärung von der gleichen Größenordnung.

Ich untersuchte die Gärung und Atmung, jede getrennt, unter Anwendung des Warburg-Barcroft-Manometers. Meine Feststellung sollte sein, ob die Mindestkonzentration der 100%igen Gärungshemmung mit deren der 100%igen Atmungshemmung zusammenfällt. Benutzt wurden die gleichen Stoffe, die im vorigen Abschnitt erwähnt sind. Hierbei war es möglich, bei einem Teil der Substanzen eine 100%ige Gär- und Atmungshemmung zu erreichen. Bei dem anderen Teil war dies im Gegensatz zu meinen Beobachtungen bei der untergärigen Brauereihefe keineswegs möglich. Man könnte in solchen Fällen geneigt sein, die höchst erreichbare Konzentration des Stoffes anzuwenden und die entstandene Hem-

mung der Gärung und Atmung durch Vergleich mit deren Leerversuch zu ermitteln. Dies ist aber nicht möglich, da die beiden Funktionen in Wechselwirkung miteinander stehen. Die zahlreichen Untersuchungen Meyerhofs[58]) zeigen uns dies in aller Deutlichkeit. Genannter Forscher hat nämlich folgende, recht interessante Feststellung gemacht: Bei Messung der aeroben und anaeroben Atmung und Gärung ergibt sich, daß 1 Molekül veratmeten Sauerstoffs einen Gärungsumsatz entsprechend 1½ bis 2 Kohlensäuremolekülen zum Verschwinden bringt, d. h. die Oxydation von 1 Molekül Zucker schützt 4 bis 6 Zuckermoleküle vor der Vergärung. — Die Folge dieses Ergebnisses ist also, daß, wenn wir auf irgendeine Weise die Atmung hemmen, die Gärung sofort ansteigt. Meyerhof konnte diese Tatsache sowohl durch Benutzung von Stickstoff (anaerobe Verhältnisse) wie auch durch Zusatz geringer Mengen von Blausäure beweisen. Wegen dieses Umstandes würde man Werte erhalten, die durchaus zu irgendwelchen Vergleichen unbrauchbar wären. Aus diesem Grunde ergriff ich eine andere Methode: Ich untersuchte nicht die höchst erreichbaren Konzentrationen der Stoffe, sondern diejenigen Konzentrationen, die mir aus meinen Versuchen über die Gärungshemmung mit untergäriger Brauereihefe als gleichwertig erschienen und zwar die Mindestkonzentrationen für 100%ige Gärhemmung.

Betrachten wir die im experimentellen Teil angeführten Resultate, zunächst Gruppe I, so ersehen wir, daß bei keinem Stoffe für die 100%ige Hemmung der Atmung eine größere Mindestkonzentration gefunden wurde, als für die 100%ige Gärungshemmung nötig war. Auch bei der Gruppe II ist dasselbe Bild: Die Atmung ist stets mehr gehemmt und hier zwar erheblich mehr als die Gärung. Es soll damit keineswegs gesagt werden, daß die Mindestkonzentration der 100%igen Atmung, vielmehr zeigen die Werte bei Paraoxybenzoesäure, Salicylsäure und Benzoesäure, daß dies nicht der Fall zu sein braucht. Ich glaube eher, daß die Verhältnisse bei den von mir geprüften Stoffen folgendermaßen liegen: Je geringer die Atmung in Traubenzuckerlösung wird, um so mehr steigt die Gärung. Dies wird natürlich eine Grenze finden; denn schließlich wird irgendwann ein Gleichgewicht entstehen müssen, da wir keine Berechtigung haben, der Gärung, im Vergleich zur Atmung im Stoffwechselprozeß der Hefe den Vorzug zu

geben. Nach Eintritt des Gleichgewichtes wirkt dann die hemmende Wirkung der chemischen Substanz sowohl auf Atmung wie Gärung und unter der Annahme, daß dies nunmehr gleichmäßig erfolgt, sehen wir, daß die Atmung bald äußerst klein wird, während die Gärung trotz der gleichen prozentualen Abnahme (nach dem Gleichgewicht) immer noch groß ist. Dies hat zur Folge, daß die Atmung früher aus dem exakten Meßbereich verschwindet als die Gärung. Es können also Fälle vorkommen, bei denen die Atmung als praktisch verschwunden erscheint, während sie wahrscheinlich doch mit noch empfindlicheren Apparaturen meßbar wäre. Hiermit dürfte eine Erklärung dafür gegeben sein, weshalb bei einigen Stoffen die Mindestkonzentration der 100%igen Hemmung bei der Gärung und der Atmung gleich, bei anderen dagegen ein wenig verschieden war. In Wirklichkeit besitzen, meines Erachtens, Atmung und Gärung die gleiche Mindestkonzentration der 100%igen Hemmung.

Bei der Gruppe II der Resultate ist folgendes Bild: Beim Benzyl- und Propylester der p-Oxybenzoesäure und beim Anissäuremethylester ist die Atmung gehemmt, während die Gärung stimuliert ist; das oben erwähnte Gleichgewicht ist noch nicht erreicht. Beim Chlorpropyl- und Isopropylester der p-Oxybenzoesäure ist jedoch das Gleichgewicht überschritten und die gärungshemmende Wirkung der Stoffe macht sich deutlich bemerkbar.

Wir ersehen aus alledem, welche Komplikationen und scheinbare Widersprüche durch die von Meyerhof gefundene Wechselwirkung zwischen Atmung und Gärung erklärt werden können.

3. Abtötende Wirkung.

Bis jetzt haben wir untersucht, welche Wirkungen eine Reihe chemischer Substanzen auf die beiden Funktionen der Hefe, Atmung und Gärung, ausüben. Nunmehr werden wir uns mit der Frage beschäftigen, ob die betreffenden Stoffe auch das Leben der Hefezelle zerstören. Ich möchte darauf nochmals hinweisen, daß diese Frage nicht völlig klar ist, da wir nichts Näheres über die Lebensfunktionen der Hefezelle aussagen können. Dennoch ist es meist üblich und einigermaßen sicher festgestellt worden, daß Hefezellen, die mit

geeigneten organischen Farbstoffen behandelt, den Farbstoff sofort aufnehmen, als „tot" anzusehen sind. Z. B. zeigt die Acetonhefe keine ungefärbten Zellen beim Zusatz von Methylenblau- oder Erythrosinlösung; andererseits kann man wohl annehmen, daß die Hefe nach einer derartig scharfen und langen Behandlung mit Aceton und Aether tatsächlich tot ist. Dies spricht also für die Brauchbarkeit der Färbmethode, insofern als Zellen, die sich sofort auffärben, als sicher tot anzusehen sind.

Bei meinen Versuchen benutzte ich Erythrosinlösung (0,5%ig). Die zugesetzten chemischen Substanzen wie auch die Hefesorten waren dieselben wie im Abschnitt über die Gärungshemmung angegeben sind. Es ergab sich, daß sämtliche der vollkommen hemmenden Stoffe, außer Salicylsäure, in der Mindestkonzentration der vollkommenen Hemmung, binnen 1 Tag tötend wirken. Salicylsäure wirkte erst nach dem 7. Tage 100%ig abtötend. Nunmehr setzte ich Versuche an zur Feststellung der 100%igen Abtötung bei der Salicylsäure. Ich fand, daß die Konzentration von 0,09% Salicylsäure hierzu notwendig ist, damit die Hefe in 1 Tage abgetötet wird. Es läßt sich keine berechtigte Begründung für dieses eigenartige Verhalten der Salicylsäure aufstellen.

Schlußfolgerungen.

I. Die bisher häufig beobachtete starke Verzögerung des Eintrittes der sichtbaren Gärung bei Trockenhefen und dergleichen gegenüber frischer Hefe, die sog. Induktionsperiode, wird ganz erheblich herabgesetzt oder bei manchen Hefekonzentrationen ganz aufgehoben, wenn das Gärgemisch durch Schütteln und dergleichen dauernd in Bewegung gehalten wird.

Soweit eine Induktionsperiode dann doch noch besteht, wird sie durch eine scheinbare notwendige Akkumualation eines für den Gäranfang benötigten Stoffes verursacht. Dieser Stoff ist aller Wahrscheinlichkeit nach das Hexosediphosphat.

Die Aufnahme geeigneter Farbstoffe durch die Hefezelle ist entgegen anderer Angaben zur Unterscheidung einer lebenden und toten Zelle brauchbar; notwendig ist aber, daß die tote Hefezelle nicht bereits durch das wässrige Medium so ausgelaugt ist, daß in der Zelle Substanzen, die den Farbstoff absorbieren, nicht mehr vorhanden sind.

Als besonders geeigneter Farbstoff zur Unterscheidung der lebenden und toten Hefezelle erwies sich Erythrosinlösung.

Ein Verschwinden des Zuckers bei Gegenwart von toter, aber noch gärfähiger Hefe vor Beginn der Gärung war im Gegensatz zu den Angaben anderer Autoren unter den von mir gewählten Bedingungen nicht festzustellen.

II. Soweit eine vollkommene Unterbindung der Gärung und der Atmung der Hefezelle durch die verwendeten Giftstoffe erzielbar war, fand diese für beide Lebensbetätigungen in denselben, oder nahezu zusammenliegenden Mindestkonzentrationen statt. Beide, durch Fermente bedingte Lebensfunktionen der Hefe werden somit durch die geprüften Giftstoffe ganz gleichmäßig geschädigt. Dieselbe Gleichmäßigkeit bestand auch für die durch die Färbbarkeit festgestellte abtötende Wirkung der Stoffe auf die gesamte Hefezelle. Eine Ausnahme machte hier die Salicylsäure, von welcher zur Erzielung der Abtötung innerhalb 24 Stunden eine erheblich höhere Mindestkonzentration nötig war als zur vollen Verhinderung der Gärung und Atmung; für letztere beiden Hefefunktionen war die verhindernde Mindestkonzentration dieselbe.

Die hier beobachteten Beziehungen zwischen der chemischen Konstitution der Stoffe und der schädlichen Wirkung auf die Hefezelle decken sich vollkommen mit den insbesondere von Th. Sabalitschka und seinen Mitarbeitern bisher beobachteten Wirkungen solcher Stoffe auf Mikroorganismen. Es fällt die Wirkung von der Salicylsäure bis zur p-Oxybenzoesäure, zwischen beiden Säuren steht die Benzoesäure. Die Veresterung der p-Oxybenzoesäure steigert die schädigende Wirkung auf die Mikroorganismen, die Steigerung nimmt zu mit der Größe des in den Ester eingeführten Alkyls. Alle hier verwendeten Stoffe, auch die p-Oxybenzoesäure, schädigen die Hefezelle bedeutend stärker als das bekannte Bakterizid Phenol.

Die hier gefundene, gleichmäßige Giftwirkung dieser Substanzen auf die verschiedenen Lebensfunktionen der Hefezelle berechtigt zu der Annahme, daß auch bei anderen Mikroben die verschiedenen Lebensfunktionen oder sogar die Gesamtheit der Lebensfunktionen in gleicher Weise gleichartig beeinflußt werden. Diese Tatsache würde die bereits häufig festgestellte Eignung der Ester der p-Oxybenzoesäure zur Konservierung und Desinfektion gut erklären.

Experimenteller Teil.

I. Vorversuche.

1. Induktionsperiode.

Versuchsreihe I. Es sollte festgestellt werden, ob die von mir benutzte, frische Trockenhefe (Institut für Gärungsgewerbe, Berlin-Seestr.), die eine Brauerei-Unterhefe war, eine Induktionsperiode aufwies:

Die Versuche wurden mit 1%iger Traubenzuckerlösung (Schering-Kahlbaum, wasserfrei, reinst) ausgeführt. Die Beobachtung der entwickelten CO_2-Menge machte ich im Einhorn-Röhrchen bei 37° C.

Menge Trockenhefe auf 10 cm³ in Gramm	Kohlendioxydmenge in cm³ nach 10	20	40	60 min.
0,5	0	0	0,1	0,5
1,0	0,3	3,4	über 5,0	abgebrochen

Also war die scheinbare Induktion ca. 40 min. bei 0,5 g Trockenhefe. In Wirklichkeit war keine Induktion vorhanden, wie unten gezeigt wird.

Nunmehr stellte ich Versuche mit dem Barcroft-Manometer an. In das Gefäßchen kamen jeweils 2 ccm 1%ige Traubenzuckerlösung. Die zugesetzte Trockenhefenmenge variierte ich.

Versuchstemperatur 19° C.

Hefemenge auf 2 ccm Zuckerlsg. in mg.	Hefekonz. in Prozenten	Ging die Gärung sofort vor sich?	Korrigierte Druckanzeige an Manometer in mm Brodielsg.
50,0	2,50	ja	106,0
25,0	1,25	„	40,1
12,5	0,62	„	18,5
6,5	0,32	„	8,2
3,0	0,15	„	4,0

Man ersieht, daß wenn das Gärgefäß nicht dauernd geschüttelt wird, also oben im Einhorn-Röhrchen, eine Induktion vorgetäuscht wird. Die von mir benutzte Trockenhefe ruft beim Schütteln keine Induktionsperiode hervor.

Reihe II. 1 g Trockenhefe wurde in 1%iger Traubenzuckerlösung geschüttelt und in ein Einhorn-Röhrchen gegossen. Nach 15 min. wurde das Gärgut abzentrifugiert, 2 ccm Flüssigkeit abpipettiert und in ein Gefäßchen des Barcroft-Manometers gebracht. Zu dieser Lösung gab ich 100 mg Brauereiacetonhefe, die ich nach der Methode von Albert & Rapp aus untergäriger Brauereihefe (Inst. f. Gärungsgew. Berlin) hergestellt hatte, sowie 100 mg Traubenzucker.

Versuchstemperatur 28° C.

	Induktionsdauer	Korrigierte Druckanzeige am Manometer in mm Brodielösung nach 60 min.
100 mg Acetonhefe mit 2 ccm 1%iger Traubenzuckerlösung	80 min	———
100 mg Acetonhefe mit 100 mg Traubenzucker zu 2 ccm von der Trokkenhefe-Gärflüssigkeit	keine Induktion	Mittelwert 166,7

Zur Kontrolle wurde festgestellt, daß die Trockenhefe-Gärflüssigkeit als solche mit 100 mg Traubenzucker versetzt nicht in Gärung geriet (untersucht am Barcroft-Manometer).

Reihe III. 1,5 g Acetonhefe wurde mit 10 ccm 1%iger Traubenzuckerlösung bei 37° C in Gärung versetzt und zwar so lange, bis das Einhorn-Röhrchen 1 ccm CO_2 anzeigte. Darauf wurde das Gärgut abzentrifugiert. 2 ccm der Gärflüssigkeit wurde in das Gefäßchen des Barcroft-Manometers gebracht und 100 mg Traubenzucker sowie 100 mg Acetonhefe hinzugefügt.

Versuchstemperatur 28° C.

	Induktionsdauer	Korrigierte Druckanzeige am Manometer in mm Brodielösung nach 60 min.
100 mg Acetonhefe mit 2 ccm Traubenzuckerlösung	80 min	———

	Induktionsdauer	Korrigierte Druckanzeige am Manometer in mm Brodielösung in 60 min.
2 ccm der Acetonhefe-Gärflüssigkeit + 100 mg Acetonhefe + 100 mg Traubenzucker	keine Induktion	32,1

Reihe IV. 0,5 g Acetonhefe wurde zu 10 ccm 1%iger Traubenzuckerlösung zugesetzt, ein Einhorn-Röhrchen damit aufgefüllt und bei 37° C zur Gärung aufgesetzt. Eine solche Acetonhefekonzentration besitzt eine Induktionsperiode von 80 min, wie ich durch gesonderten Versuch feststellte. Ich unterbrach die Versuche nach 20, 30, 40 und 60 min., zentrifugierte die Hefemasse ab, gab 2 ccm der Gärflüssigkeit zu 100 mg Acetonhefe und 100 mg Traubenzucker. Keine der Gärflüssigkeiten war imstande die Induktionsperiode der Acetonhefe aufzuheben.

Reihe V. 1 g Trockenhefe (bezw. 3 g Acetonhefe) wurde zu 10 ccm 1%iger Traubenzuckerlösung zugegeben. Nach 3-stündigem Verweilen bei 37° C wurde die Hefemasse abzentrifugiert und in 2 ccm der Gärflüssigkeit 100 mg Acetonhefe und 100 mg Traubenzucker zugefügt. Eine Aufhebung der Induktionszeit konnte nicht festgestellt werden. Andererseits konnte ich ersehen, daß die Gärflüssigkeit kein Zucker mehr enthielt, also ausgegoren war.

Reihe VI. 3 g Acetonhefe + 20 ccm Wasser wurden 2 Stunden lang auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Nach Abzentrifugieren der Hefemasse wurden 2 ccm von dem Schüttelsaft zu 100 mg Acetonhefe und 100 mg Traubenzucker hinzugesetzt. Die Induktionsperiode wurde von 80 auf 20 min abgekürzt.

Reihe VII. Die Gärflüssigkeiten II und III waren noch imstande noch viel längere Induktionsperioden, durch äußerst kleine Acetonhefekonzentrationen erzeugt, aufzuheben. Die entsprechenden Versuche stellte ich im Barcroft-Manometer mit 50, 25, 12, 6 und 3 mg Acetonhefe an unter Benützung von 2 ccm der Gärflüssigkeit und 100 mg Traubenzucker. Die Flüssigkeit fing stets sofort zu gären an. Diese Versuche zeigten sehr deutlich, wie wirksam die Gärflüssigkeiten sind.

2. Aufnahme von Farbstoffen durch Aceton- und Trockenhefe.

Zur Nachprüfung der Beziehung des Gärvermögens und der Färbbarkeit der Hefe mit Methylenblau stellte ich folgende Versuche an:

Versuch I. 1,5 g Trockenhefe + 1%ige Traubenzuckerlösung brachte ich bei 37° C zur Gärung. Nach ca. 30 min. waren weit über 5 ccm CO_2 entwickelt. Ich untersuchte die Hefezellen auf ihre Fähigkeit Farbstoffe aufzunehmen. Ich benutzte Löfflers Methylenblau sowie 0,5%ige Erythrosinlösung. Es ergab sich, daß die Färbbarkeit der Zellen keineswegs abgenommen hatte.

Ich wiederholte den Versuch an Acetonhefe, die ich nach der Methode von Albert & Rapp aus untergäriger Brauereihefe hergestellt hatte.

Versuch II. 3 g frische Acetonhefe + 1%ige Traubenzukkerlösung wurden bei 37° C zur Gärung gebracht. Nach ca. 15 min. waren bereits über 3 ccm CO_2 entwickelt. Die Hefezellen färbten sich aber nach wie vor 100%ig durch die Farblösungen auf.

Versuch III. 2 g Acetonhefe versetzte ich mit 10 ccm destilliertem Wasser und ließ die Suspension im Einhorn-Röhrchen bei 37° C stehen. Nach ca. 15 Stunden konnte ich feststellen, daß sämtliche Zellen sich nicht mehr vollständig auffärben ließen. Vielmehr war ein kleiner gefärbter Kern zu erkennen; rings um den Kern bis zur Membran sah die Zelle vollkommen leer aus. Besonders deutlich war dies zu merken, wenn als Vergleich frische Hefe, die sich ja auch nicht auffärbte, herangezogen wurde. Man konnte bei der frischen Hefe eine Lichtbrechung erkennen und außerdem feststellen, daß die Zellen voller Inhalt sind.

Versuch IV. Die gleichen Beobachtungen wie beim Versuch III konnte ich bei Anwendung von 1 g Trockenhefe und 10 ccm destilliertem Wasser machen.

Versuch V. Nun brachte ich eine Suspension von 3 g Acetonhefe und 10 ccm 1%iger Traubenzuckerlösung bei 37° C in Gärung und untersuchte stündlich die Färbbarkeit. Es zeigte sich, daß nach ca. 5 Stunden die Zellen einen schmalen, ungefärbten Rand aufwiesen. Dieser unfärbbare Rand wurde bei den späteren Färbungen immer breiter, bis nach 15 Stun-

den nur noch ein ganz kleiner, hell gefärbter Kern ersichtlich war.

Versuch VI. Die gleichen Resultate wie bei V erzielte ich bei Anwendung von 1,5 g Trockenhefe.

Versuch VII. Ebenso konnte ich feststellen, daß es gleichgültig ist, wenn man anstatt Zuckerlösung bei den Versuchen V und VI destilliertes Wasser benutzt.

Versuch VIII. Die Versuche V—VII wiederholte ich bei den Temperaturen 0° und 19°. Bei 0° konnten die gleichen Beobachtungen erst nach 4 Tagen gemacht werden. Bei 19° war die vollkommene Auffärbarkeit nach 25 Stunden aufgehoben. Es besteht also eine Parallelität zwischen Erhöhung der Versuchstemperatur und Versagen der Färbbarkeit.

Versuch IX. Um den Austritt von Eiweißstoffen aus der Hefezelle zu prüfen, untersuchte ich die Substrate (nach Abzentrifugieren der Hefe) in den Versuchen V—VII auf Eiweißstoffe.

Die Millonsche Probe war stark positiv. Es zeigte sich, daß bei eintretendem Versagen der Färbung nur Spuren Eiweiß nachzuweisen sind, während mit der Zeit bis zum völligen Versagen immer mehr Eiweißstoffe im Substrat vorhanden waren.

Ließ man das Substrat an der Luft für einige Stunden stehen, so konnte man eine deutliche bakterielle Zersetzung der Eiweißstoffe feststellen und zwar durch H_2S-Entwicklung, die ich durch den Geruch, Nitroprussidnatrium- und Bleiacetat-Probe nachweisen konnte. Die Gärsubstrate frischer Hefe zeigten dieses Verhalten keineswegs.

Versuch X. Es sollte festgestellt werden, welche Mengen an Hefemasse aus der Hefezelle heraustreten:

250 mg Trockenhefe, deren Wassergehalt durch Trocknen bei 100° vorher bestimmt worden war, wurden mit 10 ccm 1%iger Traubenzuckerlösung im gewogenen Zentrifugenröhrchen bei 37° C in Gärung versetzt. Nach ca. 15 Stunden wurde abzentrifugiert, die Flüssigkeit vorsichtig dekantiert und die Hefemasse mit destilliertem Wasser durch Aufschwemmen und Abzentrifugieren gewaschen. Das Auswaschen wurde 3-mal wiederholt. Darauf wurde die Hefe im Röhrchen bei 100° getrocknet und gewogen.

Gewichtsverlust der Trockenhefe: im Mittel 155,9 mg. 250 mg der benutzten Trockenhefe enthielten 19,4 mg Wasser;

das Trockengewicht der 250 mg Trockenhefe war also 230,6 mg. Demnach hatten 230,6 mg Trockenhefe um 155,9 mg abgenommen, also 67,4% an Hefemasse.

3. Brauchbarkeit der Farblösungen zur Unterscheidung von frischer und toter Hefe.

Benutzt wurde Preßhefe (Bäckereihefe). Die untersuchten Farblösungen waren Methylenblau (Kahlbaum) 1:1000 und 0,5-prozentige Erythrosinlösung. Die Beobachtungen wurden jeweils sofort nach Zugabe des Farbstoffes vorgenommen. Es wurde eine Suspension der Hefe hergestellt und zwei gleiche Teile daraus gemacht. Der eine Teil wurde für 1 min aufgekocht und darauf abgekühlt. Ich stellte fest, daß der ungekochte Teil sich nicht auffärben ließ, während der gekochte sich 100%ig färbte. Nunmehr mischte ich die beiden Teilsuspensionen. Dieselbe enthielt also praktisch gleiche Mengen tote wie lebende Zellen. Durch Zufügen des Farbstoffes und Betrachten des mikroskopischen Bildes konnte ich diese Tatsache bestätigen. Bei Verwendung der Erythrosinlösung war die Unterscheidung zwischen gefärbten und ungefärbten Hefezellen besonders deutlich zu ersehen, so daß man in Uebereinstimmung mit Devreux & Tanner dieser Farblösung den Vorzug geben muß.

Außerdem überprüfte ich die Angaben von Brandrup unter Anwendung der vollkommenen gleichen Versuchsobjekte und -bedingungen. Eine Bestätigung seiner Angaben gelang mir jedoch nicht.

4. Angeblicher Zuckerschwund vor Beginn der Gärung.

0,5 g Trockenhefe wurde mit 10 ccm 1%iger Traubenzuckerlösung versetzt und eine Suspension hergestellt. Je 2 ccm von der Suspension wurde in das Gärgefäßchen des Barcroft-Manometers gebracht. Das eine Gefäßchen wurde nicht geschüttelt, während das andere von Anfang an geschüttelt wurde. Bei diesem war eine sofortige Gasentwicklung bemerkbar, während beim anderen Manometer das Niveau auf der O-Marke blieb. Nunmehr schüttelte ich das zuvor in Ruhe sich befindende Gärgefäßchen und unterbrach andererseits die

Schüttelbewegung des anderen Gefäßchens. Ich beobachtete dann, daß die CO_2-Entwicklung bei dem geschüttelten Manometer einsetzte, während dieselbe beim anderen aufhörte.

Versuche mit Acetonhefe:

Es war festgestellt worden, daß 0,5 g Acetonhefe in ca. 1%ige Traubenzuckerlösung gebracht bei Zimmertemperatur eine Induktionsperiode von ca. 80 min. besitzt. Ich stellte nun eine Anzahl solcher Acetonhefe-Zucker-Suspensionen her und unterbrach die Induktion nach verschiedenen Zeiten. Ich untersuchte daraufhin sofort das Gärgut auf Zuckerverlust, konnte einen solchen, wie aus der unten angeführten Aufstellung ersichtlich, nicht feststellen. Die Zuckerbestimmung erfolgte nach der Bertrand'schen Methode[62]).

Versuchstemperatur bei allen Versuchen 24° C.

Gruppe I.

Inkubationsdauer in min.	Verbrauch an $KMnO_4$-Lösung in ccm	im Mittel
0 (Vergleichsmessung mit benutzter Zuckerlösung)	10,07 10,23	10,15
15	10,07 10,32	10,20
30	10,35 10,35	10,35

Gruppe II.

Inkubationsdauer in min.	Verbrauch an $KMnO_4$-Lösung in ccm	im Mittel
0 (Vergleichsmessung mit benutzter Zuckerlösung)	10,98 10,98	10,98
60	10,69 10,72	10,71
75	10,60 10,88	10,74

Gruppe III.

Inkubationsdauer in min.	Verbrauch an $KMnO_4$-Lösung in ccm	im Mittel
0 (Vergleichsmessung mit benutzter Zuckerlösung)	11,95 11,75 12,10	11,93
10	12,00 11,80	11,90
40	11,83 12,10	11,97

Gruppe IV.

Inkubationsdauer in min.	Verbrauch an $KMnO_4$-Lösung in ccm	im Mittel
0 (Vergleichsmessung mit benutzter Zuckerlösung)	11,88 12,20 11,88	11,99
75	12,30 12,08 12,00	12,13

Vergleichen wir die einzelnen Werte innerhalb einer Gruppe miteinander, so erkennen wir deutlich, daß von einem Zuckerschwund nicht die Rede sein kann.

II. Einwirkung von Giftstoffen auf die lebende Hefezelle.

1. Beeinflussung der Gärkraft der Hefe.

In der vorliegenden Arbeit ist für die genauen Bestimmungen das Barcroft-Manometer benutzt worden. Da sowohl die Apparatur, als auch die Methodik sehr ausführlich von R. Siebeck[59]) in den „Biochemischen Arbeitsmethoden" wie auch von Oppenheimer & Pincussen[60]) in der „Methodik der Fermente" angegeben sind, so begnüge ich mich hier übersichtshalber in großen Zügen die Arbeitsmethode, sowie die speziell von mir gewählte Versuchsanordnung zu beschreiben.

Ich benutzte einen zylindrischen mit Wasser gefüllten Zinkbehälter als Thermostaten. Der Behälter war durch einen Mikrobrenner sehr genau bei konstant bleibender Temperatur zu halten. Bei manchen Versuchen schloß ich außerdem einen Quecksilber-Toluol Thermoregulator an. An dem Behälter ließen sich 3 Barcroft-Manometer anbringen und zwar so, daß die Gär- bezw. Atmungsgefäßchen, gänzlich ins Wasser tauchten. Im Inneren der Gefäßchen waren ca. 1 ccm fassende zylindrische Einsätze angeschmolzen, die bei den Atmungsversuchen Verwendung fanden. Der Inhalt der Gefäßchen war ca. 20 ccm. Die Gefäßchen waren derart mit dickwandigem Gummischlauch mit dem Manometerrohr verbunden, daß sie unabhängig vom Manometer geschüttelt werden konnten. An dem Boden der Gefäßchen waren nach außen ein ca. 5 cm langes Glasrohr angeschmolzen, das mit Gummischlauch überzogen wurde. Durch eine kombinierte Rühr- und Schüttelvorrichtung konnte gleichzeitig das Wasser des Zinkbehälters gerührt, wie auch das Manometergefäßchen durch Anschlagen eines Metallblättchens an das angeschmolzene Röhrchen des Gefäßchens geschüttelt werden. Es erfolgten pro Gefäßchen ca. 100 Anschläge pro min. Von den 3 Manometern war das eine stets als Thermobarometer in Gebrauch. Dasselbe zeigte die kleinsten Schwankungen der Temperatur des Behälters sowie des Luftdruckes an. Es wurde gleichzeitig immer ein Kontrollversuch angesetzt.

Die Manometerfüllung (nach Brodie) besteht aus einer Flüssigkeit, die durch Lösen von 23 g Natriumchlorid, 5 g Natriumcholeonicum und etwas Thymol entsteht. Durch Zusatz von etwas Methylenblau kann man die Flüssigkeit in der Manometerkapillare besser sichtbar machen. Eine solche Lösung hat ein spezifisches Gewicht von 1,034, dann übt eine Säule von 10 000 mm den Druck von 1 Atmosphäre aus. Auf diese Weise werden Berechnungen sehr vereinfacht. Außerdem besitzt die Lösung den Vorzug, nicht an der Wand der Kapillare zu haften.

„Vor Inbetriebnahme einer neuen Apparatur muß man sich überzeugen, ob alle Schliffe des Manometers usw. intakt sind. Dazu ist ein Leerversuch nötig: Angefeuchtete Atmungsgläser, bei denen man die Temperatur des Wasserbades allmählich hinaufheizt. Ist alles in Ordnung, dann müssen die Manometeranschläge aller Garnituren den gleichen Ausschlag

in mm geben, denn der Druck ist nur abhängig von der Temperatur und dem Barometerstand und nicht von den Volumina der Gefäße." (Vgl. Trautwein[61]).

Will man die absolute Menge des gebildeten Gärungskohlendioxyds wissen, so berechnet man sie nach folgender, mittels der Gasgesetze aufgestellten Formel:

$$x = \frac{p.\ v.}{10\,000.\ (1+\beta t)} + \frac{a.\ p.\ F.}{10\,000}$$

Hierbei bedeuten:

x gesuchtes Volumen,
p korrigierte Druckzunahme (d. h. Differenz aus der abgelesenen Druckzunahme und dem gleichsinnig abgelesenen Ausschlage des Thermobarometers).
v das Volumen in dem die Druckzunahme entstanden ist, Volumen des Gefäßes gerechnet bis zur beliebig einzustellenden O-Marke am Manometer minus Volumen der Lösung),
t Temperatur des Thermostaten,
a Absorptionskoeffizienten für CO_2 bei der Versuchstemperatur,
F Volumen der Lösung.

Der zweite Bruch kann meist vernachlässigt werden. Die gleiche Formel wird auch zur Ausrechnung des Sauerstoffverbrauches bei der Atmung benutzt.

Bei Atmungsversuchen wird das gebildete Kohlendioxyd durch Anbringen von Alkalilauge in das Einsatzgefäßchen absorbiert, so daß nur der Sauerstoffverbrauch angezeigt wird.

Beim Anbringen der Gefäße in das Bad ist bei offenen Hähnen bis zur Temperaturkonstanz zu schütteln. Meist genügt hierzu eine Schütteldauer von 10 min. Während dieser Zeit ist auch, wie ich mich überzeugen konnte, bei Atmungsversuchen, das CO_2 der Luft durch die Lauge absorbiert, so daß es nicht als Fehlerquelle in Frage kommt.

Bei exakten Bestimmungen empfiehlt es sich, mit einem Puffer zu arbeiten. Ich benutzte primäres Alkaliphosphat (nach Sörensen). Sekundäres Phosphat kompliziert unnötig die manometrischen Messungen, da das CO_2 chemisch gebunden wird nach der Gleichung:

$$Na_2HPO_4 + H_2CO_3 = NaHCO_3 + NaH_2PO_4$$

Es sei noch erwähnt, daß die Untersuchungsdauer bei lebender Hefe möglichst kurz zu wählen ist, damit durch Vermehrung der Hefezellen nicht veränderte Versuchsbedingungen entstehen. Es ist üblich, die Versuchsdauer zwischen 45 bis 120 min. zu halten.

Gärungsversuche: Benutzt wurde die untergärige Brauerei-Reinzuchthefe Rasse U. Eine Agarkultur derselben wurde vom Inst. für Gärungsgewerbe, Berlin, bezogen. Durch Ueberimpfen auf 30 ccm ungehopfte Bierwürze war bereits nach 24 Stunden eine leichte Trübung der Würze zu konstantieren (bei Zimmertemperatur). Es mußte nunmehr von Zeit zu Zeit für ein paar Minuten geschüttelt werden. Nach weiteren 48 Stunden hatte sich ein Hefebrei abgesetzt. Die Würze wurde nun dekantiert, die Hefe mit Wasser aufgenommen und durch mehrmaliges Abzentrifugieren und Auswaschen mit der Zucker-Phosphat-Lösung (vgl. unten) von den letzten Resten der Würze befreit. Zugleich entstand ein Gleichgewicht zwischen der Hefe und der Zucker-Phosphatlösung.

Die Zucker-Phosphatlösung enthielt in einem Liter 20 g Traubenzucker und 17,5 g primäres Kaliumphosphat (nach Sörensen.)

Die Hefekonzentration wurde so dosiert, daß sich in 2 ccm Nährlösung ca. 8 mg Hefe bei den Versuchen befanden. Da die Hefeausbeute in der Würze stets ziemlich die gleiche ist, so kann man durch einmaliges Ausprobieren feststellen, welche Menge Nährlösung notwendig sei, damit die benötigte Hefekonzentration entsteht. Es kam dann noch die jeweilig zu untersuchende Giftstoffmenge zu der Suspension. War bei den höheren Giftkonzentrationen ein Erhitzen zum Lösen des Giftstoffes notwendig, so wurde der Hefebrei nachträglich mit der den Giftstoff enthaltenden Zucker-Phosphatlösung aufgenommen.

Da es bei meinen Versuchen nicht darauf ankam, die absolute Gasmenge festzustellen, benutze ich folgende Methode, um die prozentuale Gärungshemmung zu ermitteln: Ich stellte an ein und demselben Manometer einmal die Druckzunahme während eines bestimmten Zeitintervalls (meist 45—60 min.) für die Zucker-Phosphat-Hefesuspension und dann für dieselbe Suspension aber in Anwesenheit des betreffenden Giftstoffes fest. Nach Korrektion der Werte durch Berücksichtigung der Ausschläge des Thermobarometers, konnte ich er-

rechnen, welcher prozentuale Gärungsbetrag verschwunden war, d. h. um wieviel die Gärung gehemmt worden war. Es werden also bei dieser Methode die anfänglichen Gärgeschwindigkeiten miteinander verglichen. Dadurch, daß man diese Methode einheitlich bei allen Versuchen durchführt, ist es möglich, Vergleiche anzustellen und Hemmungskurven zu zeichnen.

———

Als Beispiel einer solchen manometrischen Gärungshemmung-Mesung: Es sollte untersucht werden, welchen Einfluß 0,025% Benzoesäure auf die Gärung ausübt:

Versuchsbedingungen:

Die Gefäßchen enthielten 2 ccm Lösung. Die Zucker-Phosphat-Lösung enthielt 2% Traubenzucker und 1,75% primäres Kaliumphosphat (Sörensen).

Benutzte Heferasse: Reinzuchthefe Rasse U.

Hefekonzentration: ca. 8 mg in 2 ccm Lösung.

Versuchstemperatur: 28° C.

Versuchswerte:

Zeit in min.	Manometer II. (Giftstoff) Ablesg.	Druckzunahme	Korrig. Druckzunahme	Manometer III. (ohne Gift) Ablesg.	Druckzunahme	Korrig. Druckzunahme	Thermobarom. (Zuckerlsg.) Ablesg.	Druckzunahme
0	290,0	—	—	290,0	—	—	290,0	—
5	278,4	11,6	11,8	271,0	19,0	19,2	290,2	+0,2
10	264,7	13,7	13,7	251,2	19,8	19,8	290,2	—
15	250,9	13,8	14,0	231,4	19,8	20,0	290,4	+0,2
20	236,4	14,5	14,8	211,3	20,1	20,4	290,7	+0,3
25	221,7	14,7	14,5	190,2	21,1	20,9	290,5	—0,2
30	206,8	14,9	14,7	168,6	21,6	21,4	290,3	—0,2
35	191,3	15,5	15,5	147,6	21,0	21,0	290,3	—
40	176,1	15,2	14,9	126,6	21,0	20,7	290,0	—0,3
45	160,7	15,4	15,2	105,6	21,0	20,8	289,8	—0,2
		Summe:	129,1		Summe	184,2		

Zeit in min.	Manometer II (ohne Gift) Ablesg.	Druckzunahme	Korrig. Druckzunahme	Manometer III (Giftstoff) Ablesg.	Druckzunahme	Korrig. Druckzunahme	Thermobarom. (Zuckerlösg.) Ablesg.	Druckzunahme
0	290,0	—	—	290,0	—	—	290,0	—
5	270,0	20,0	20,0	278,5	11,5	11,5	290,0	—
10	249,9	20,1	19,9	266,4	12,1	11,9	289,8	—0,2
15	228,8	21,1	21,0	254,0	12,4	12,3	289,7	—0,1
20	206,5	22,3	22,1	240,9	13,1	12,9	289,5	—0,2
25	184,0	22,5	22,3	226,8	14,1	13,9	289,3	—0,2
30	161,2	22,8	22,8	213,0	13,8	13,8	289,3	—
35	139,8	21,4	21,4	199,5	13,5	13,5	289,3	—
40	118,1	21,7	21,4	186,2	13,3	13,0	289,0	—0,3
45	96,2	21,9	21,7	172,7	13,5	13,3	288,8	—0,2
		Summe:	192,6		Summe	116,1		

Also war noch von der Gärungsgröße übrig:

Manometer II $\frac{129{,}1 \cdot 100}{192{,}6} = 67\%$

Manometer III $\frac{116{,}1}{184{,}2} \cdot 100 = 63\%$

Im Mittel: 65%

Demnach hat 0,025% Benzoesäure eine Gärungshemmung von 35% hervorgerufen.

Auf die oben angegebene Weise erhielt ich folgende Werte, die ich dann als Kurven aufzeichnete:

p-Oxybenzoesäure-Methylester		Salicylsäure	
Konzentration in Prozenten	Prozentuale Hemmung	Konzentration in Prozenten	Prozentuale Hemmung
0,050	11	0,0075	— 6
0,075	21	0,010	— 11
0,100	29	0,015	— 12
0,150	43	0,020	+ 9
0,225	63	0,023	78
0,275	83	0,025	100
0,300	100		

p-Oxybenzoesäure-propylester

Konzentration in Prozenten	Prozentuale Hemmung
0,001	— 8
0,0025	— 9
0,005	— 16
0,010	— 11
0,020	+ 10
0,035	+ 48
0,045	100

P-Oxybenzoesäure

Konzentration in Prozenten	Prozentuale Hemmung
0,100	4
0,150	18
0,200	54
0,250	75
0,300	97
0,360	99
0,400	100

p-Oxybenzoesäure-Chlorpropylester (Alk.)

Konzentration in Prozenten	Prozentuale Hemmung
0,006	31
0,010	54
0,015	75
0,020	95
0,022	100

Phenol

Konzentration in Prozenten	Prozentuale Hemmung
0,050	7
0,100	16
0,200	29
0,400	54
0,600	85
0,680	100

p-Oxybenzoesäure-benzylester (Alk.)

Konzentration in Prozenten	Prozentuale Hemmung
0,0025	19
0,005	42
0,010	73
0,015	95
0,018	100

Benzoesäure

Konzentration in Prozenten	Prozentuale Hemmung
0,025	35
0,050	63
0,075	83
0,100	92
0,140	100

p-Oxybenzoesäure-isopropylester (Alk.)

Konzentration in Prozenten	Prozentuale Hemmung
0,020	35
0,040	67
0,050	73
0,060	85
0,085	100

Anissäuremethylester (Alk.)

Konzentration in Prozenten	Prozentuale Hemmung
0,030	10
0,050	18
0,060	30

(Alk.) bedeutet, daß die betreffenden Stoffe wegen ihrer Schwerlöslichkeit in Wasser durch vorheriges Auflösen in 1% absolutem Alkohol und darauffolgendes Eingießen der warmen Zucker-Phosphat Lösung löslich gemacht wurden.

2. Beeinflussung der Atmung der Hefe im Vergleich mit der gleichzeitigen Beeinflussung ihrer Gärkraft.

Ich benutzte aus den im allgemeinen Teil erwähnten Gründen Preßhefe (Bäckerhefe).

Die Versuche wurden mit dem Barcroft-Manometer bei 28° C ausgeführt. Da die Bestimmung den im Vorigen genau beschriebenen Gärungsmessungen ähnlich ist, so erübrigt es sich noch einmal darauf einzugehen. Während bei der Gärung die Druckzunahme gemessen wird, wird hier lediglich die Abnahme abgelesen.

Die Zuckerphosphatlösung enthielt 2% Traubenzucker und 1,75% primäres Kaliumphosphat. Die Hefemenge wurde jedesmal abgewogen.

Ich erhielt die in den Tabellen angegebenen Werte:

Versuche mit Preßhefe — Atmung und Gärung.

Gruppe I.

Stoff	Konz. in Proz. bei 100%iger Hemmung	
	Gärung	Atmung
p-Oxybenzoesäure	0,450	0,450
Phenol	0,830	0,750
p-Oxybenzoesäuremethylester	0,400	0,350
Salicylsäure	0,042	0,042
Benzoesäure	0,140	0,140

Gruppe II.

0,5 g Hefe auf 40 ccm Zucker-Phosphat-Lösung.

Stoff	Konz. des Stoffes in Prozenten	Wirkung auf Gärung und Atmung in Prozenten im Vergleich zum Leerversuch	
		Gärung	Atmung
Benzylester	0,018	140	14
Propylester	0,045	155	14
Chlorpropylester	0,022	83	2
Isopropylester	0,085	95	21
Anissäuremethylester	0,060	197	54

Bei II. sind die betreffenden Konzentrationen gewählt worden, da sie diejenigen Größen sind, die wie aus den Kurven ersichtlich ist, mit untergäriger Hefe 100% Hemmung er-

geben hatten, also in ihren Wirkungen auf Gärung und Atmung wohl miteinander verglichen werden dürfen. Beim Anissäuremethylester wurde die höchst erreichbare Konzentration genommen, die aber wie aus der Hemmungskurve hervorgeht, mit untergäriger Hefe nur 30%Hemmung ergab. Die Werte sind also nicht ohne weiteres mit den anderen zu vergleichen.

Bei II. nahm ich ferner eine niedrigere Hefekonzentration, da ich hoffte auf diese Weise eine vollständige Hemmung zu erreichen. Da dies jedoch bis zur höchsten Löslichkeit im Wasser nicht gelang, griff ich wie bereits erwähnt, die obigen Konzentrationen der Stoffe heraus, die wenigstens Vergleichswerte ergeben.

3. Abtötende Wirkung.

Um ergänzungshalber festzustellen, welche Wirkung auf das Hefeplasma die von mir untersuchten Stoffe in der Mindestkonzentration der 100%igen Hemmung der Gärung haben, ließ ich die betreffenden Gifte auf die sich in der Nährlösung befindliche Hefe einwirken. Die Heferasse und Konzentration war dieselbe wie bei den Gärungsversuchen (Rasse U). Auch hier wurden diejenigen Stoffe, die sich in Wasser schwer lösten durch vorheriges Auflösen in absolutem Aethylalkohol und darauffolgendes Eingießen der Zucker-Phosphat-Lösung lösbar gemacht. Die Lösung enthielt dann 1% Alkohol. Die betreffenden, durch Alkohol in Lösung gebrachten Stoffe wurden dann mit Versuchen ohne Giftstoff verglichen, die ebenfalls 1% Alkohol enthielten. Für die anderen Stoffe war die Vergleichslösung die Hefe enthaltende Zucker-Phosphat-Lösung (2% Traubenzucker, 1,75% primäres Kaliumphosphat).

Die Färbung geschah mit 0,5%iger Erythrosinlösung. Ich fand, daß außer Salicylsäure, alle anderen Stoffe binnen 24 Stunden tötend wirken. Salicylsäure wirkte erst nach dem 7. Tage 100%ig abtötend.

Nunmehr vergrößerte ich die Konzentration der Salicylsäure und konnte folgende Aufstellung machen:

Konzentration in Prozenten	Prozentuale Menge der „toten Zellen“ nach 1 Tage
0,04	ca. 5
0,06	20—30
0,08	60—70
0,09	100

Die vorliegende Arbeit habe ich im chemisch-biologischen Laboratorium des Herrn Professor Dr. Dr. Th. Sabalitschka ausgeführt und ich möchte auch an dieser Stelle Herrn Professor für die dauernde Förderung der Arbeit meinen aufrichtigsten Dank aussprechen.

Literatur.

1. Zymasegärung, 1911.
2. Ann. Inst. Pasteur, 26/16, 1912.
3. Zeitschr. Physiolog. Chemie, 102/185, 1918.
4. Journal prakt. Chemie, 64/1, 1901.
5. Trav. de la Soc. de Nat. de St. Petersbourg, 34, 1905.
6. Zeitschr. Physiolog. Chemie, 59/281, 1907.
   Centralbl. f. Bakt., (2), 24/1, 1909.
7. Centralbl. f. Bakt., (2), 26/178, 1910.
8. Proc. Roy. Soc., 82/327, 1910.
9. Proc. Chem. Soc., 21/189, 1905.
10. Zeitschr. Physiolog. Chemie, 85/192, 1913.
11. Alcoholic. Fermentation, S. 37, 1911.
    Biochemical Journ., 19/LXXI, 1925.
12. Fermentforschg., 5/142, 1921.
13. Zeitschr. Physiolog. Chemie, 134/1, 1924.
14. Zymasegärung, 1911.
15. Biochemical Journ., 19/LXXI, 1925.
16. Zeitschr. Physiolog. Chemie, 159/85, 1926.
17. 8. Jhrg., Neue Folge1, Fermentforschg. Jhrg. 4, S. 574, 1926.
18. 1. c. (15).
19. Biochemical Journ., (II.), 22/786, 1928.
20. Chem. Zentralbl., I/3570, 1930.
21. Biochem. Zeitschr., 88/145, 1918.
22. Biochemical Journ., 14/642, 1920.
    Biochemical Journ., 15/175, 1921, (I).
23. 1. c. (22).
24. Biochem. Zeitschr., 186/313, 1927.
25. Journ. Biolog. Chem., 79/621, 1928.
26. Dissertation Berlin, 1931.
27. Centralbl. Bakt. II., VII/737, 1901.
28. Euler & Lindner, Chem. d. Hefe u. der alk. Gärg., S. 132.
29. Mikrosk. u. Biolog. Betriebskontrolle, Berlin 1930, S. 444.
30. Wochenschr. Brauerei, 88, 1930.
31. Jour. Phisiolog. Chem., 24/741, 1920.

32. Journ. of. Bact., 14/327, 1927.
33. 7 th. Intern. Congress of Applied Chem., Sec. VI, B., 1910.
34. Apotheker Zeitung, 522, 1930.
35. Fermentforschg., 11/22, 1929.
Chem. Zentralbl., II., 2573, 1929.
36. l. c. (13).
37. Desinfektion II., Heft 7—10, 1926.
Apothek. Ztg., 43/670, 1928.
Pharmaz. Ztg., 75/454, 1930.
38. Pflügers Archiv, 170/367, 1918.
Pflügers Archiv, 170/473.
39. Vgl. Lindner, Wochenschr. f. Brauerei, 30/133, 1913.
40. Koll. Zeitschr., 6/297, 1910.
41. Botan. Ber., 28/480, 1910.
42. Internat. Zeitschr. f. physik.-chem. Biol., 1/284, 1914.
43. Biochem. Zeitschr., 98/179, 1919.
44. Vierteljahrsber. d. Naturforschunges., Zürich.
40/159, 1895; 41/383, 1896; 44/88, 1899.
45. Pflügers Archiv, 42/517, 1888.
46. Zeitschr. Physiolog. Chem., 42/309, 1904.
47. Biochem. Zeitschr., 18/211, 1909
48. Biochem. Zeitschr., 130/239, 1922.
49. Biochem. Zeitschr., 183/369, 1927.
50. Pflügers Archiv, 156/443, 1914.
51. Zeitschr. Physiolog. Chemie, 188/133, 1930.
52. Archiv f. exptl. Pathol. u. Pharmak., 122/129, 1927.
53. Biochem. Zeitschr., 162/43, 1925.
54. Biochem. Zeitschr., 229/128, 1930.
55. Archiv. d. Pharmazie, 669, 1929.
56. 1. c. (28), S. 322, 1915.
57. 1. c. (53).
58. 1. c. (53), S. 83.
59. Abderhaldens Biochem. Arbeitsmethoden, Bd. VIII/33.
60. Fermente, Bd. III, (Methodik), S. 635.
61. Biochem. Zeitschr. 229/132, 1930.
62. Vgl. Rona: Praktikum d. Physiol. Chem., S. 144.

Lebenslauf.

Geboren am 25. Mai 1907 in Teheran (Persien) genoß ich meine erste Schulbildung in London auf der Latymer Upper School. Darauf kam ich nach Berlin, wo ich 1926 auf der Leibniz-Oberrealschule, Charlottenburg, die Reifeprüfung bestand. Ich kehrte dann in die Heimat zurück und unterrichtete während eines Schuljahres Deutsch und Physik an der Persisch-Deutschen Gewerbeschule in Teheran. Im Wintersemester 1927 ließ ich mich an der Philosophischen Fakultät der Universität Berlin immatrikulieren. Ein Jahr später erhielt ich von der Persischen Regierung ein Stipendium. Ich legte beide Teile des chemischen Verbandsexamens am 1. Chemischen Institut der Universität ab. Darauf begann ich im Wintersemester 1931 meine Doktorarbeit im Chemisch-Biologischen Laboratorium des Herrn Prof. Dr. Th. Sabalitschka.